Université catholique de Louvain
Earth and Life Institute - Agronomy

Temperature rise and water stress effects on four bee-pollinated species and impacts on bumblebee foraging behavior

---

Charlotte Descamps

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Membres du jury :

Président	Pr. Pierre Bertin (UCLouvain, Belgique)
Promotrice	Pr. Anne-Laure Jacquemart (UCLouvain, Belgique)
Co-promotrice	Pr. Muriel Quinet (UCLouvain, Belgique)
Lecteurs	Pr. Stanley Lutts (UCLouvain, Belgique) Pr. Denis Michez (UMons, Belgique) Pr. Nina Hautekèete (Université de Lille, France)

"Not a single bee has ever sent you an invoice. And that is part of the problem - because most of what comes to us from nature is free, because it is not invoiced, because it is not priced, because it is not traded in markets, we tend to ignore it."

- Pavan Sukhdev, United Nations report, The Economics of Ecosystems and Biodiversity, October 2010.

Table des matières

Remerciements ..... **XIII**

Résumé ..... **XVII**

Partie I : Introduction générale **19**

1. Contexte général de l'étude **21**

2. Généralités sur la pollinisation entomophile **21**

2.1. Pollinisation 21
2.2. Insectes pollinisateurs 23
2.3. Signaux floraux d'attraction 24
2.4. Ressources collectées et nutrition des abeilles 26
2.5. Choix de visites 28
2.6. Réseaux d'interaction entre plantes et pollinisateurs 29
2.7. Perspectives évolutives 30

3. Pressions sur les écosystèmes **31**

3.1. Crise de la biodiversité 31
3.2. Menace sur la pollinisation 32
3.3. Evolution du climat et projections futures 33
3.4. Adaptation des plantes et des insectes pollinisateurs à ces contraintes 36
3.4.1. Modifications phénologiques 36
3.4.2. Modification de l'aire de répartition géographique 37
3.4.3. Modifications intra-spécifiques 37

4. Effets des sécheresses et des hausses de température sur les plantes **39**

4.1. Définition des stress et stratégies de réponses des plantes 39
4.1.1. Stress abiotiques 39
4.1.2. Focus sur les hausses de température et les sécheresses 40
4.2. Conséquences sur la croissance végétative 41
4.3. Modifications des processus physiologiques clés 43
4.3.1. Relations hydriques et nutritives 43
4.3.2. Photosynthèse 44
4.3.3. Dommages oxydatifs 47
4.4. Conséquences sur la floraison et la phase reproductive 48
4.4.1. Durée de floraison et nombre de fleurs 48
4.4.2. Pollen, gamétophyte mâle 49
4.4.3. Carpelle, gamétophyte femelle 49

4.4.4. Couleur et odeur des fleurs 50
4.4.5. Production de nectar 50
4.4.6. Pollinisation et succès reproducteur....51

5. Effets des sécheresses et hausses de température sur les insectes pollinisateurs 51

5.1. Effets sur leur physiologie et leur reproduction....51
5.2. Effets sur leur nutrition 53

6. Questions de recherche et organisation de la thèse 54

7. Références....58

Chapter 1 : The effects of drought on plant-pollinator interactions : what to expect?....73

Abstract 76

1. Introduction....76

2. Methods 79

3. Results....79

3.1. Results depend on the methods used....79
3.2. Changes in floral signals decrease plant attractiveness....81
3.2.1. Smaller plants with fewer flowers 88
3.2.2. Flower size reduction....89
3.2.3. Flower color preserved 90
3.2.4. Olfactory signal modification....90
3.3. Floral rewards are declining, decreasing food supply for pollinators 91
3.3.1. Nectar volume decreased while nectar concentration and composition were less affected 91
3.3.2. Failures of pollen maturation under water stress....92

4. Consequences for plants and pollinators under drought 92

4.1. Complex responses for pollinator visitation rate 92
4.2. Plant reproductive success negatively affected 93
4.3. Food supply for pollinators, quantity, and probably quality reduced under drought.94

5. Conclusion: What's next?....94

6. Bibliography....96

7. Supplementary data....104

Partie II : Impacts de la hausse de température et du stress hydrique sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux des 4 espèces modèles (*Borago officinalis*, *Echium plantagineum*, *E. vulgare*, *Impatiens glandulifera*) 109

Introduction du protocole expérimental..... 110

Chapter 2 : Temperature and water stress affect plant-pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae) 115

Abstract 120

1. Introduction..... 120

2. Material and methods..... 122

2.1. Plant material and growth conditions 122
2.2. Vegetative trait measurements..... 123
2.3. Physiological parameters 123
2.4. Flower trait and flower reward measurements 124
2.5. Insect visitor observations..... 125
2.6. Statistical analyses..... 125

3. Results 127

3.1. Vegetative traits 127
3.2. Photosynthesis-related parameters 130
3.3. Flower traits 132
3.4. Flower rewards..... 134
3.5. Flower visitation by bumblebees 135
3.6. Principal component and correlation analyses 135

4. Discussion 137

4.1. Do temperature and water stress interact in their effect on plant functions? 137
4.2. Do temperature and water stress influence floral traits and floral rewards directly or indirectly? 140
4.3. Do these stresses modify flower visitation by insects? 141

5. References 143

Annexe..... 152

Chapter 3 : Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (*Echium*, Boraginaceae)..... 155

Abstract 160

1. Introduction..... 160

2. Material and methods..... 161

2.1. Plant material and growth conditions..... 161
2.2. Growth conditions..... 162
2.3. Morphological traits..... 163
2.4. Physiological traits..... 163
2.5. Floral and nectar traits..... 163
2.6. Statistical analyses..... 163

3. Results..... 164

3.1. Differences in physiology and morphology between the two *Echium* species..... 164
3.2. Photosynthesis-related parameters..... 167
3.3. The influence of temperature and water stresses on reproductive morphology..... 171
3.3.1. Floral display and flowering phenology..... 171
3.3.2. Floral morphology..... 175
3.3.3. Nectar rewards..... 175

4. Discussion..... 176

5. References..... 179

Annexe..... 183

Chapter 4 : Growing and flowering in a changing climate: effects of higher temperatures and drought stress on the bee-pollinated species *Impatiens glandulifera* Royle 185

Abstract 190

1. Introduction..... 191

2. Results..... 192

2.1. Vegetative and physiological parameters..... 192
2.2. Floral traits and resources..... 195
2.3. Principal component analysis..... 198

3. Discussion 200

4. Material and methods 203

4.1. Plants and growth condition 203
4.2. Vegetative and physiological parameters 205
4.3. Measurements of floral traits and resources 205
4.4. Statistical analyses 206

5. References 207

Annexe 217

Partie III : Impacts de la hausse de température et du stress hydrique sur la quantité et composition de ressources florales et les répercussions sur le comportement de visites des pollinisateurs 219

Chapter 5 : Climate change–induced stress reduces quantity and alters composition of nectar and pollen from a bee-pollinated species (*Borago officinalis*, Boraginaceae) 221

Abstract 224

1. Introduction 224

2. Materials and methods 226

2.1. Plant material and growth conditions 226
2.2. Nectar sampling and chemical analyses 227
2.3. Pollen sampling and chemical analyses 228
2.4. Statistical analyses 228

3. Results 229

3.1. Floral resources were affected by temperature and water stress 229
3.2. The influence of temperature and water stress on nectar 230
3.2.1. Nectar volume 230
3.2.2. Nectar sugar composition 233
3.2.3. Nectar amino acid content 235
3.3. The influence of temperature and water stress on pollen 236
3.3.1. Pollen quantity 236
3.3.2. Pollen polypeptides 236
3.3.3. Pollen amino acid content 236

4. Discussion 238

5. Reference 242

6. Supplementary material 248

Chapter 6 : Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. 253

Abstract 258

1. Introduction 259

2. Material and methods 260

2.1. Plant material 260
2.2. Insects 261
2.3. Experimental plant growth conditions 261
2.4. Visual floral trait and flower reward measurements 262
2.4.1. Visual signals 262
2.4.2. Floral resources 262
2.5. Experimental design of plant–insect interactions 262
2.6. Training phase and visiting observations 263
2.7. Statistical analyses 263

3. Results 265

3.1. Effects of higher temperature on plant attractiveness 265
3.1.1. Floral traits 265
3.1.2. Floral rewards 265
3.2. Effects of higher temperature on plant–insect interactions 267

4. Discussion 268

5. References 271

Annexe 278

Partie IV : Discussion générale 279

1. Effets additifs de la hausse de température et du stress hydrique 280

2. Adaptation du développement végétatif 282

2.1. Sénescence foliaire et modification de l'architecture des plantes 282
2.2. Réponses contrastées des capacités photosynthétiques 284

3. Développement reproducteur mis à mal par la hausse de température et le stress hydrique 287

3.1. Réallocation des ressources et limitation vers les organes reproducteurs 287
3.2. Modification des signaux visuels 288
3.3. Influences sur les quantités et les compositions des ressources florales 290
3.3.1. Diminution marquée de la quantité de nectar et modification de la composition en acides aminés 290
3.3.2. Diminution de la quantité de pollen et influence sur la teneur en polypeptides .. 292

4. Modification du comportement des insectes pollinisateurs et conséquences potentielles sur les interactions plantes-pollinisateurs 293

4.1. Diminution des visites sur les fleurs de plantes stressées 293
4.2. Impact sur les populations d'insectes pollinisateurs via une limitation de la quantité de ressources 296
4.3. Impact sur les populations d'insectes pollinisateurs via une modification de la composition des ressources florales 297
4.4. Impact des hausses de température et sécheresses sur les interactions plantes-pollinisateurs 299

5. Limites de l'étude 300

5.1. Complexité des changements climatiques 300
5.2. Autres effets sur les interactions plantes-pollinisateurs 300
5.3. Effets des adaptations locales de populations 301
5.4. Contraintes techniques liées aux chambres de culture 301

6. Conclusion 303

7. Perspectives 303

8. Références 305

Productions scientifiques durant la thèse 316

Remerciements

Mon assistanat à la Faculté des Bioingénieurs m'aura donné l'opportunité de réaliser ce doctorat, quelle aventure ! Une aventure que je ne suis pas prête d'oublier, qui aura été riche de rencontres, d'apprentissages et de partages.

Mes premiers remerciements s'adressent à mes co-promotrices de thèse. Anne-Laure, je tiens en particulier à te remercier pour ton dynamisme à toute épreuve, ta bonne humeur et la confiance que tu m'as octroyée durant 6 années, ce fût un réel plaisir de collaborer avec toi sur de nombreux projets autant en recherche qu'en enseignement (je ne peux m'empêcher d'épingler cette flore… !). Avec le mémoire, tu m'as donné goût à la thématique pollinisateurs et à la recherche scientifique en me permettant de faire un magnifique terrain au Mont Lozère. Merci vraiment pour toutes les opportunités que tu m'as permis de saisir durant ces 6 années de collaboration. Muriel, je tiens à te remercier pour ton soutien sans faille durant tout mon doctorat, ton suivi régulier et ta grande disponibilité. Grâce à toi, j'ai presque pris autant goût à la physiologie végétale qu'aux pollinisateurs ! Je te remercie vraiment pour ton « compagnonnage » scientifique. Si je suis arrivée au terme de ce doctorat, c'est grâce à votre complémentarité de personnalité mais aussi d'expertises, vraiment Merci à vous deux.

Je remercie cordialement le président du jury, Pr. Pierre Bertin, ainsi que les membres du jury, Pr. Stanley Lutts, Pr. Denis Michez, Pr. Nina Hautekèete pour l'intérêt et le temps consacré à mon travail ainsi que leurs conseils et commentaires lors de la défense privée. Ceux-ci furent précieux pour l'amélioration du manuscrit.

Si je suis arrivée au terme de ce doctorat, c'est grâce à l'investissement de mes mémorantes. Merci à la première équipe en 2015, Aurélie, Sophie, Najet. Je pataugeais tout autant que vous et vous avez réussi à tirer votre épingle du jeu en travaillant chacune sur une espèce différente ; vos mémoires ont permis d'établir le protocole expérimental de ma thèse. Merci à la seconde équipe en 2018, Sophie et Anne. Sophie, tu as permis de compléter l'étude d'une espèce modèle, ta précision m'a permis de réutiliser directement tes données. Anne, tu t'es arraché les cheveux avec nos ruches de bourdons… énorme merci à toi d'avoir eu la persévérance de travailler avec ces bourdons « naïfs » et la patience de réaliser toutes ces observations. Enfin, merci aussi à Marie, Clémence et Fanny qui ont également réalisé leur mémoire avec moi mais dont les données n'ont finalement pas été intégrées à cette thèse. Un dernier merci à Archibald d'avoir aussi débroussaillé le sujet des analyses de composition du pollen sous la supervision d'Anne-Laure.

Ces 6 années à la Faculté des Bioingénieurs auront été particulièrement riches de rencontres. Je tiens à remercier particulièrement l'équipe des assistants, Antoine et Laurie, avec qui durant deux années, j'ai partagé la présidence de l'A^3, mais aussi Lola, Lisa,

Romain, Antoine, Aubry avec qui j'ai collaboré sur des tâches d'enseignement. Je tiens à adresser un merci tout particulier à François, ami doctorant recruté comme « assistant » lors d'une quinzaine de la bière, qui a pris à bras le corps la mise en place des TP de dynamique de groupe (BIR1270) avec moi, et que j'ai entrainé dans la formation ComColors ®. François, quel plaisir de co-enseigner avec toi, nous avons formé un beau duo, un peu jaune, orange, mauve, bleu, merci pour ta disponibilité et ton écoute durant cette période chamboulée. Ensuite, je tiens aussi à remercier les académiques avec qui j'ai eu la chance de travailler, Pr. Philippe Baret (analyses des systèmes), Pr. Pierre Delmelle, Pr. Yannick Agnan (projet diagnostic environnemental), Pr. Anne Legrève (biologie des interactions) et Pr. Guillaume Lobet (biologie végétale et son fameux BioGo ou plutôt QuoVidi!); sans oublier mes co-promotrices avec qui j'ai également eu des tâches d'enseignement, Anne-Laure (systématique, biologie des interactions, phytosociologie), Muriel (projet diagnostic environnemental, modélisation végétale). Un merci particulier à Philippe pour ton soutien durant tout ce parcours de doctorat et les pauses « radiateurs » ; en tant que Doyen de la Faculté, tu as toujours pu dégager quelques minutes de ton temps pour les assistants, merci pour ta disponibilité et la confiance accordée pour la gestion des TP. J'ai eu la chance de contribuer au développement de plusieurs nouveaux modules de TP lors de la réforme du bachelier bioingénieur, merci de m'avoir laissé autant de liberté de création, et les nombreuses discussions « pédagogiques » que ces créations ont suscitées m'ont été d'un grand apprentissage. Même si cela n'a pas toujours été facile de jongler avec le doctorat en parallèle, cela a été une source inépuisable de motivation durant ces 6 années. J'aimerais terminer en remerciant Julie du Louvain Learning Lab, une rencontre qui a mené à une belle amitié. Julie, merci de nous avoir aidé et soutenu dans la mise en place des TP avec François ; avant chaque réunion, nous étions tous les deux impatients de te voir car on savait qu'on en ressortirait avec mille idées positives. Je ne pourrais terminer ce paragraphe sans souligner l'aide indispensable apportée aussi par Pierre Van Thorre pour toutes les cueillettes de plantes, Pierre Lhoir pour les TP de phytosociologie, que de bons moments partagés, et toute l'équipe administrative de la faculté pour la gestion des TP.

Côté recherche, les collègues croisés durant ces 6 années ont été nombreux, et encore plus, quand on déménage après 4 ans. Merci à l'équipe GENA POPS qui m'a accueilli pour mon mémoire et mon début de thèse. Christel, fidèle compagne durant ces 6 années...et qui m'a aussi permis d'arriver au terme de cette aventure. Merci pour ta présence, ton écoute et tout le travail que tu as fourni pour ce projet de recherche, tu as toujours été d'une grande disponibilité et prête à aider dès que j'en avais besoin. Encore un Merci avec un grand M pour toutes les manip's en particulier du chapitre 5 ; tu y as passé un paquet d'heures « à ma place » car une petite chenille s'était installée dans mon ventre. Pierre, ton incroyable énergie et force de travail m'ont toujours impressionné…merci pour toute l'aide apportée au début de mon parcours de doctorat ; ton départ de l'équipe a marqué la fin des pauses « radiateurs », la fin des délicieux desserts, la fin des fleurs sur mon bureau, et toutes ces attentions du quotidien ☺ Laura, merci à toi aussi pour toute l'aide durant le mémoire et toutes les discussions pollinisateurs que nous avons pu échanger. Véronique, merci pour les nombreuses

discussions à la cafét', et surtout ton soutien sans faille jusqu'à la veille de ma défense privée…ce soutien a été très précieux. Je voudrais aussi remercier l'équipe de Natagriwal, en particulier, Pierre-Yves, Arnaud, Matthieu, Hubert, Céline et Béatrice. Merci aussi à l'équipe de Nitrawal, Olivier, Marc et Christian dont les bonjours quotidiens me faisaient le plus grand plaisir. Les deux dernières années, malheureusement marquées par le contexte covid, se sont déroulées avec l'équipe PEPA, merci Valentin, Lola, Clothilde, Adrien, Nicolas, Clément et Thomas pour votre bonne ambiance et votre bienveillance à mon égard. Merci aussi Anne, Isabelle et Adeline pour toute l'aide administrative. PEPA est un labo où il fait bon vivre ! Maintenez cette ambiance ☺ Je tiens aussi à remercier pour toute l'aide apportée pour la gestion des cultures, l'équipe des Serres, Marc et Brigitte en particulier. Durant ces 6 années, j'ai aussi eu la chance de faire partie de l'ACELI ; cette association m'aura permis de rencontrer de très chouettes personnes dans l'institut, au delà des équipes de recherche parfois un peu cloisonnées ! J'épingle en particulier, le projet Compost et l'ELI-day, deux projets qui ont été initiés au début de ma thèse et qui ont vu le jour grâce à l'énergie déployée par le collectif ACELI ; sans oublier, les fameux drinks des 24h et le vélo ELI. Merci à tous ceux avec qui j'ai pu collaborer à l'ACELI.

Merci aussi à mes relecteurs de thèse « last-minute », Fred, Jeanne, François, Seb et Papa, merci pour votre disponibilité pour retrouver toutes les coquilles juste avant de déposer ce manuscrit.

Mes derniers remerciements s'adressent à toutes les personnes qui m'ont accompagnée au quotidien ces dernières années. Mes très chers parents pour leur soutien sans faille, leur disponibilité à toute épreuve et tous les encouragements qu'ils m'ont apportés durant toutes mes études. Si je suis arrivée là j'en suis, c'est grâce à vous les amis ; mon Merci est rempli de gratitude à votre égard. Seb, tu as finalement été celui qui a suivi ma thèse au plus près, merci pour toutes les discussions qui m'ont permis d'avancer dans mes recherches et toutes les idées que nous avons générées en brainstormant, merci pour tous les arrosages de plantes pour lesquels tu m'as aidé chaque été, merci pour tout le soutien y compris dans les moments les plus difficiles et les plus creux du doctorat. Ce doctorat aurait eu une toute autre saveur sans ta présence et ton soutien au quotidien, un merci infini à toi. Et finalement, notre Juliette, notre challenge supplémentaire cette année, qui nous a rejoint en novembre 2020, m'a donné l'énergie pour aller au bout de cette thèse. Juliette, ton sourire a eu le pouvoir magique de me maintenir connectée avec toi même dans les derniers instants bien intenses de la thèse et de me rappeler « qu'il y a une vie après la thèse » ☺

Résumé

Les changements climatiques impactent les écosystèmes à l'échelle du globe. Dans les régions tempérées, on constate depuis plusieurs décennies des modifications climatiques telles que des sécheresses plus fréquentes ainsi qu'une température moyenne plus élevée. Or, ces deux paramètres - la disponibilité en eau et la température - sont fondamentaux pour le développement des plantes. La majorité des plantes en zone tempérée dépendent des insectes pour assurer leur reproduction. Les pollinisateurs, en butinant, récoltent des ressources florales, du pollen et du nectar, dont ils dépendent parfois exclusivement pour leur alimentation. Les plantes attirent les pollinisateurs grâce à des signaux floraux (taille de la fleur, quantité de ressources florales, etc.). Si ces signaux sont modifiés, la relation mutualiste peut être compromise ce qui se répercute sur les deux partenaires, les plantes et les pollinisateurs. Ma thèse vise à étudier les modifications des signaux floraux induites par les changements climatiques ainsi que les répercussions potentielles pour le comportement des pollinisateurs. Les plantes, durant leur période de floraison, ont été soumises à des stress combinés. Ces stress consistent en une hausse de température (+3°C ,+6°C) et un arrosage réduit (teneur en eau du sol <15-30%), en conditions contrôlées. Pour étudier les impacts de ces stress, 4 espèces modèles ont été choisies: *Borago officinalis*, *Echium plantagineum*, *E. vulgare* et *Impatiens glandulifera* pour leur grande attractivité vis-à-vis des pollinisateurs. Collectivement, les résultats des recherches menées dans le cadre de cette thèse confirment que ces stress modifient les signaux floraux des plantes. Sous stress, les plantes ont produit moins de fleurs et celles-ci avaient une taille nettement réduite. Les ressources florales ont, elles aussi, nettement diminué sous stress et leur composition (quantité de sucres dans le nectar, contenu en protéines du pollen) a été affectée. Quand les pollinisateurs ont été soumis à un choix binaire entre des fleurs « non stressées » et « stressées », 75% d'entre eux se sont orientés vers des fleurs non stressées. Ces résultats indiquent que la modification des signaux floraux des plantes stressées est perceptible par les insectes. Bien que les espèces étudiées aient développé différentes stratégies qui limitent l'impact négatif des hausses de température et du stress hydrique, les traits floraux et les récompenses florales ont été affectés négativement par ces stress, compromettant l'attrait des pollinisateurs et potentiellement le succès reproducteur de la plante.

Partie I : Introduction générale

1. Contexte général de l'étude

Les pollinisateurs occupent une place centrale dans les écosystèmes aussi bien naturels qu'agricoles. En collectant du pollen et en le transférant de fleur en fleur, ils permettent la reproduction sexuée des plantes entomophiles. Les pollinisateurs, quant à eux, récoltent aussi le nectar en complément du pollen et certains se nourrissent exclusivement de ces ressources florales. Cependant, les dernières décennies ont vu les populations d'insectes pollinisateurs décliner. Les causes de ce déclin sont multifactorielles, bien qu'étant le plus souvent liées à la disponibilité en ressources florales. Celles-ci sont en effet au cœur de la relation entre les plantes et leurs pollinisateurs ; leurs quantité et composition nutritives sont déterminantes. Les changements climatiques, en particulier les hausses de température et les sécheresses peuvent induire des stress pour les plantes ; la floraison et la période de reproduction sont d'ailleurs des phases du cycle des plantes très sensibles au stress. L'impact de ces stress est étudié très largement sur les plantes d'intérêt agronomique, à pollinisation anémophile, et en général, l'effet d'un seul stress est étudié. Or, la combinaison de plusieurs stress est très fréquente dans les environnements naturels et par ailleurs, 78% des plantes à fleurs sont entomophiles. En 2015, lorsque cette thèse a été initiée, il n'existait que très peu d'études sur l'impact des hausses de température ou d'un stress hydrique sur les traits floraux et les ressources florales (entre autres, Carroll *et al.* 2001; Halpern *et al.* 2010; Scaven and Rafferty 2013) ; or le manque de ressources florales était déjà bien mis en avant comme cause du déclin des populations d'insectes pollinisateurs (Goulson *et al.* 2015). L'objectif de cette thèse est dès lors de comprendre quels sont les effets possibles d'une hausse de température et de stress hydrique pour les plantes entomophiles et quelles peuvent être les répercussions potentielles sur le comportement des pollinisateurs.

2. Généralités sur la pollinisation entomophile

2.1. Pollinisation

La pollinisation se définit comme le transfert de grains de pollen depuis les anthères et leur dépôt sur les stigmates des fleurs. Pour la plante, la pollinisation est essentielle à sa reproduction. La pollinisation est qualifiée d'efficace lorsque les grains de pollen germent une fois déposés sur le stigmate et qu'ils émettent un tube pollinique menant à la fécondation d'un ovule (Fig. 1; Proctor 1973). Cette fécondation est une étape nécessaire pour la formation des graines et des fruits. La pollinisation peut se faire au sein d'une même fleur ou d'une même plante, on parlera d'auto-pollinisation ou entre plantes différentes et dans ce cas on parlera d'allo-pollinisation.

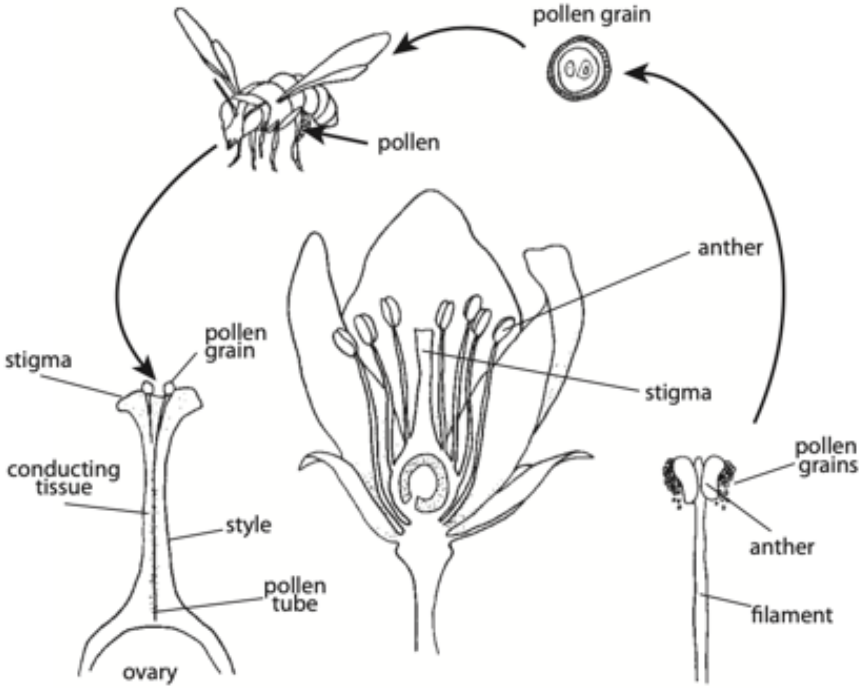


Figure 1 : Processus de pollinisation d'une fleur typique d'une espèce Angiosperme entomophile, le pollen libéré par les anthères est transporté par l'insecte sur le stigmate d'une autre fleur, le tube pollinique se développe ensuite vers l'ovaire avant de féconder un ovule (Willmer 2011).

Le transfert de pollen entre anthères et stigmates est assuré par des agents abiotiques (vent, eau, gravité) ou par des agents biotiques (animaux ; Kevan 1999; Ollerton *et al.* 2011). A travers le monde, environ 87% des Angiospermes dépendent des animaux pour leur pollinisation ; parmi ces animaux, au moins 100 000 espèces d'invertébrés (insectes) sont dénombrées ainsi que 12 000 espèces de vertébrés (oiseaux, chauve-souris, rongeurs). Les plantes dont la pollinisation est assurée par les insectes sont appelées entomophiles. La pollinisation par les animaux conduit la plupart du temps à une relation mutualiste. La plante retire en effet un bénéfice lors du passage d'un visiteur – par le dépôt de pollen, il pollinise la fleur – et le visiteur bénéfice de ressources nutritives (nectar, pollen, huiles ou autres nutriments). Cependant, tous les visiteurs ne pollinisent pas efficacement les fleurs et certains visiteurs se nourrissent des ressources sans effectuer de pollinisation (Kevan 1999). Parmi les espèces végétales qui dépendent des animaux pour leur reproduction, de nombreuses espèces peuvent assurer leur reproduction via l'auto-pollinisation et l'allo-pollinisation (Ollerton *et al.* 2011).

Parmi les animaux qui effectuent la pollinisation, ce sont les insectes qui dominent en Europe, en particulier les abeilles (Ollerton *et al.* 2011; IPBES 2016; Ollerton 2017). Ils sont essentiels pour la conservation de la biodiversité mais aussi en agriculture, pour les

productions agricoles. En effet, 75% des espèces cultivées pour la consommation humaine sont pollinisées par des insectes, ce qui représente 35% de la production agricole mondiale (Klein *et al.* 2007). En termes de revenus, cela représente 9.5% de la valeur totale de la production agricole mondiale (Gallai *et al.* 2009). En Belgique, en 2010, il a été estimé que 11.1% des espèces cultivées dépendaient des pollinisateurs (Jacquemin *et al.* 2017). Cette dépendance des cultures vis-à-vis des insectes pollinisateurs n'a cessé d'augmenter entre 1961 et 2016 (Lautenbach *et al.* 2012; Aizen *et al.* 2019).

2.2. Insectes pollinisateurs

Les insectes pollinisateurs sont une des composantes-clés des écosystèmes, ils participent à ce service essentiel qu'est la pollinisation. En Europe tempérée, parmi les insectes pollinisateurs, les abeilles (*Anthophila,* abeilles domestiques et solitaires, bourdons,..) représentent les principaux pollinisateurs (plus de 20 000 espèces sont répertoriées à travers le monde, 2000 en Europe), pratiquement toutes les espèces étant pollinisatrices (Michener 2007; IPBES 2016). Pour certains espèces végétales, elles sont les seuls pollinisateurs efficaces (Klein *et al.* 2007; Garibaldi *et al.* 2013). Par exemple, les fleurs des espèces végétales appartenant à la famille des Ericaceae et des Solanaceae présentent des anthères poricides ; seuls les bourdons (*Bombus* spp.) et quelques autres espèces sauvages (*Nomada* spp. par exemple) sont capables de faire vibrer leurs muscles thoraciques pour libérer le pollen de ce type d'anthères. Il s'agit de la pollinisation par « buzzing ».

On distingue parmi les abeilles, les espèces sociales où la femelle (reine) a des contacts avec ses filles (ouvrières stériles) pour s'occuper de la colonie (*Apis mellifera*, *Bombus* spp.) des espèces solitaires (*Andrena* spp., *Osmia* spp. par exemple) où la femelle n'a pas de contact ni avec sa descendance, ni avec d'autres femelles (Michez *et al.* 2019). Certaines espèces sont domestiquées, comme l'abeille domestique (*Apis mellifera*), comme certains bourdons (*Bombus* spp.) ainsi que certaines abeilles solitaires (*Megachile rotundata*, *Osmia* spp.,…) (Klein *et al.* 2007). La taille des colonies peut aller jusqu'à 40 000 individus chez *Apis mellifera*, ou jusqu'à quelques centaines chez les *Bombus* spp. Certaines familles d'abeilles sauvages forment aussi des petites colonies allant jusqu'à quelques dizaines d'individus (*Halictus* spp. par exemple). Les abeilles forment un groupe caractéristique en ce sens que les larves et les adultes se nourrissent exclusivement du pollen et du nectar (Michener 2007). Pour la majorité des espèces, la femelle récolte les ressources et les stocke dans un nid pour nourrir sa descendance. La zone de récolte (par rapport au nid) varie aussi suivant les espèces : les abeilles solitaires parcourent une rayon entre 150 et 600 m (cette distance est corrélée avec la taille de leur corps), tandis que certaines abeilles sociales comme *A. mellifera* ou *Bombus* spp. parcourent en moyenne entre 600 et 800 m, mais parfois jusqu'à plusieurs kilomètres (Willmer 2011). Les abeilles sont qualifiées soit de généralistes ou de polylectiques, c'est-à-dire qu'elles visitent plusieurs espèces végétales appartenant à au moins deux familles distinctes ; soit de spécialistes ou d'oligolectiques, c'est-à-dire qu'elles sont spécialisées dans leur choix de pollen et restreignent leurs visites florales à quelques espèces au sein d'une même famille, voire parfois à une seule (espèces monolectiques ; Michener 2007). Les espèces généralistes

(polylectiques, qui représentent environ deux tiers des espèces d'Europe centrale, Bogusch *et al.* 2020) se retrouvent principalement dans les zones climatiques tempérées (Michener 2007) où elles participent à la pollinisation d'une majorité d'espèces végétales (Memmott *et al.* 2004).

Les diptères, en particulier les syrphes, constituent le second groupe le plus abondant de visiteurs de fleurs. D'autres insectes, comme les papillons, certains coléoptères ainsi que certaines guêpes participent également à la pollinisation (IPBES 2016).

2.3. Signaux floraux d'attraction

Pour localiser les fleurs, les insectes pollinisateurs utilisent une série de repères, signaux ou traits floraux caractéristiques comme la couleur, la forme, les marques UV sur les pétales ou encore les odeurs. Ces signaux informent les pollinisateurs de la présence de récompenses florales. Ces signaux seront considérés comme honnêtes si effectivement, ils sont corrélés avec des ressources florales abondantes et de qualité (Knauer and Schiestl 2015). Cette relation a d'ailleurs été mise en avant par Stanton and Preston (1988) qui a montré une corrélation entre le diamètre de la corolle et le contenu en nectar et en pollen chez *Raphanus sativus*. Les pollinisateurs peuvent développer une préférence pour ces signaux honnêtes, ce qui impacte le choix de visite de pollinisateurs généralistes (Chittka 1999). Les pollinisateurs utilisent les signaux visuels et olfactifs pour choisir les fleurs ; les signaux visuels jouant un rôle prépondérant dans l'attractivité (Gumbert 2000; Burger *et al.* 2010; Sprayberry 2018; Barragán-Fonseca *et al.* 2020). De ce fait, les pollinisateurs exercent une pression de sélection forte sur les traits floraux (Schiestl and Johnson 2013). Les principaux signaux sont détaillés ci-dessous.

Signaux visuels

- Nombre de fleurs : le nombre de fleurs et la densité florale contribuent à rendre la plante attractive pour les pollinisateurs (Naug and Arathi 2007; Fowler *et al.* 2016; Bauer *et al.* 2017).
- Taille des fleurs : la taille des fleurs est en général corrélée positivement au taux de visite des fleurs ; des fleurs de grande taille sont plus visibles que des fleurs de petite taille et contiennent en général une plus grande quantité de ressources florales (Stanton and Preston 1988; Willmer 2011; Teixido *et al.* 2016).
- Forme des fleurs : les fleurs peuvent avoir une corolle plane ou une corolle tubulaire, ce qui modifie l'accessibilité des ressources florales. Les corolles tubulaires demandent aux insectes d'avoir des pièces buccales suffisamment longues pour parvenir au nectaire. Les corolles planes attirent en particulier les syrphes, les coléoptères, des hyménoptères à langue courte par rapport aux corolles tubulaires qui vont attirer des lépidoptères ou hyménoptères à longue langue (Gómez *et al.* 2008; Willmer 2011).

- Hauteur des hampes florales par rapport à leur environnement : la hauteur des fleurs ou des inflorescences renforce l'attractivité de la plante vis à vis des pollinisateurs, en rendant les fleurs plus visibles et plus accessibles (Ouvrard *et al.* 2018).
- Couleur : les pollinisateurs ont des préférences pour certaines couleurs de fleurs. Les hyménoptères ont un système de vision trichromatique avec des pics de sensitivité de certaines longueurs d'onde à 350 (UV), 440 (bleu) et 540 (vert) nm, préférant par conséquent les fleurs bleues, violettes ou roses. Les fleurs blanches et jaunes sont préférées par les diptères. Les contrastes de couleur aident aussi les pollinisateurs à détecter les fleurs (Peitsch *et al.* 1992; Briscoe and Chittka 2001; van der Kooi *et al.* 2019) ; par exemple, les bourdons naïfs n'ont pas de préférence pour une couleur en particulier mais sont particulièrement attirés par les couleurs qui contrastent fort avec leur environnement (Lunau 1991; Burger *et al.* 2010).

Signaux olfactifs

Les pollinisateurs utilisent des odeurs, constituées par des composés organiques volatiles (VOC, *volatile organic compound*) pour détecter la présence des ressources florales (Chittka and Raine 2006; Wright and Schiestl 2009). Plus de 1700 composés ont été détectés dans les fleurs (Knudsen *et al.* 2006). Ces molécules incluent des terpenoïdes, des phenylpropanoïdes, des benzenoïdes – les plus communs parmi les odeurs florales –, des dérivés d'acides gras et d'acides aminés (Knudsen *et al.* 2006; Farré-Armengol *et al.* 2013). Ces composés sont mis particulièrement en avant dans les interactions des plantes avec leurs pollinisateurs (Wright and Schiestl 2009).

Ces signaux peuvent être influencés par des facteurs biotiques ou abiotiques, ce qui peut avoir comme conséquence de modifier la guilde des pollinisateurs attirés. Dans une étude récente de Gómez *et al.* (2020) sur *Moricandia arvensis*, il est montré qu'une même plante peut produire des fleurs avec un phénotype très différent entre le printemps (fleurs rose mauve, grandes, réfléchissant les UV) et l'été (fleurs petites, blanches, absorbant les UV), ce qui a pour conséquence d'attirer des insectes différents pour sa pollinisation : des abeilles à longue langue sur les fleurs de printemps, des abeilles à courte langue, des papillons et des coléoptères sur les fleurs d'été. La plasticité florale de cette espèce est la conséquence de modification de température et de la photopériode et lui permet de fleurir et maintenir sa reproduction même dans des conditions environnementales contrastées (Gómez *et al.* 2020).

Certaines formes florales sont caractéristiques d'un pollinisateur ou d'un mode de pollinisation, ce qui a amené la notion de « syndrome de pollinisation » (Faegri and Pijl 1979). Les couleurs des fleurs pollinisées par les abeilles sont ainsi majoritairement bleues. Cependant, la pertinence de cette notion est débattue car l'identification de syndromes de pollinisation n'est pas toujours possible et de nombreuses espèces végétales sont

visitées par des pollinisateurs différents (Fenster *et al.* 2004; Dellinger 2020). Suivant Ollerton *et al.* (2009), seul un tiers des plantes peut être classé via les syndromes de pollinisation.

2.4. Ressources collectées et nutrition des abeilles

Les relations plantes-pollinisateurs dépendent essentiellement de la disponibilité et de la quantité de ressources florales (pollen et nectar). Les insectes visitent les fleurs pour collecter ces ressources, comme ressources alimentaires.

Le nectar est la principale source de sucres, et donc d'énergie, pour les insectes adultes en vol (Nicolson 2007 ; Vaudo 2015). Le nectar est exsudé par des glandes florales ou extraflorales, les nectaires. Suivant les espèces végétales, le nectar varie en termes de quantité (volume) et de qualité (contenu et composition en sucres, en acides aminés,…). Le nectar est composé principalement de 3 sucres[1] (saccharose, glucose et fructose) en proportions variables selon l'espèce, la position de la fleur au sein de l'inflorescence et les conditions climatiques (vent, humidité relative, Fig. 2, Parachnowitsch *et al.* 2019). Les sucres proviennent directement du transport par le phloème, ou sont catabolisés à partir de l'amidon stocké au niveau des nectaires, qui possèdent leur propre voie métabolique (Willmer 2011; Roy *et al.* 2017). La forme de la corolle influence aussi la concentration en sucres : les corolles à tube court ou ouvertes ont généralement un nectar plus concentré en sucres par rapport aux corolles à tube long, suite à une évaporation plus importante de l'eau composant le nectar (Pacini *et al.* 2003). Le volume de nectar, sa concentration et sa composition en sucres influencent les différents types de pollinisateurs qui sont attirés (Baude *et al.* 2016; Hicks *et al.* 2016). Le nectar contient en outre d'autres éléments, comme des acides aminés, des lipides ou divers ions organiques ou inorganiques, qui influencent également le choix de visites (Roy *et al.* 2017). La qualité du nectar est évaluée à travers son contenu en sucres principalement mais aussi en acides aminés qui sont ses deux principaux composants (Heil 2011; Nepi *et al.* 2018). La production de nectar représente un certain coût pour la plante, puisque cette production consomme jusqu'à 37% des carbohydrates produits par photosynthèse (Nepi *et al.* 2018).

[1] D'autres sucres peuvent être présents mais en moindres proportions comme le mannose, le galactose.

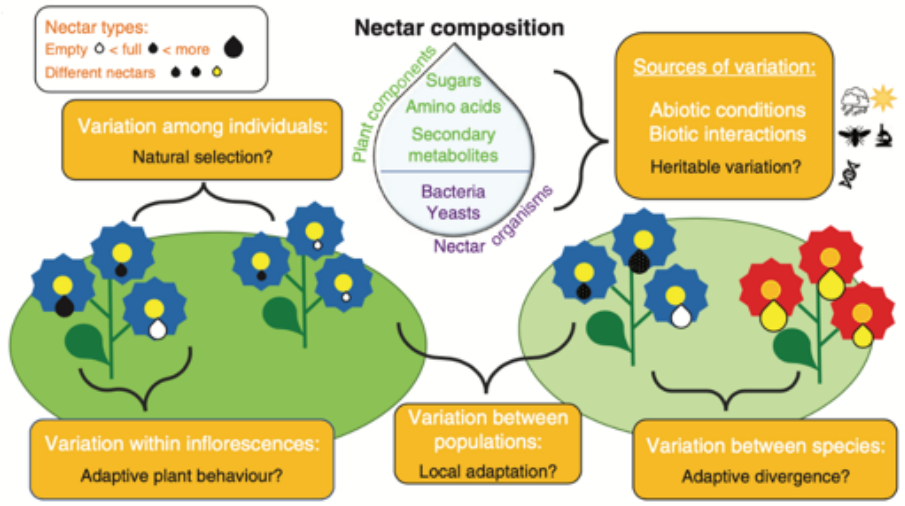


Figure 2 : Schéma conceptuel reprenant les sources de variations du nectar et les questions écologiques et évolutives qui en découlent (Parachnowitsch *et al.* 2019)

Le pollen représente une source de polypeptides, d'acides aminés essentiels mais aussi de stérols et de vitamines (Roulston and Cane 2000; Nicolson 2011; Vanderplanck *et al.* 2014; Vaudo *et al.* 2015). La quantité de pollen et sa composition chimique[2] varient selon les espèces végétales (Roulston and Cane 2000). Les protéines, les lipides et certains acides gras essentiels présents dans le pollen sont déterminants pour la physiologie des insectes et contribuent à leur bon développement (Vanderplanck *et al.* 2014; Moerman *et al.* 2015). Les insectes sont incapables de synthétiser *de novo* leurs stérols (précurseurs d'hormones de croissance, de mue, de reproduction), et dépendent en conséquence de la consommation de pollen pour leur survie (Svoboda *et al.* 1978; Vanderplanck *et al.* 2014). Les abeilles montrent une préférence pour les pollens riches en acides aminés essentiels (Cook *et al.* 2003). Un pollen de qualité influence positivement le développement des larves de *Bombus* spp. (Vanderplanck *et al.* 2014). La qualité du pollen est évaluée à travers son contenu en protéines et en acides aminés (Roulston *et al.* 2000; Nicolson 2011). Il a été montré récemment que les bourdons peuvent évaluer la qualité des ressources via leurs antennes, grâce à des signaux chemotactiles (Ruedenauer *et al.* 2015, 2017).

Les abeilles (parmi les hyménoptères, les *Antophila)* dépendent exclusivement des ressources florales comme source de nourriture pour leur développement, leur reproduction et leur santé (Michener 2007). Les adultes collectent des ressources pour eux-mêmes ainsi que pour les larves qui se nourrissent exclusivement des ressources florales collectées par les adultes. Une étude portant sur 41 espèces d'abeilles solitaires rapporte que pour 85% d'entre elles, il est nécessaire de collecter le pollen de plus de 30

[2] En général, les différentes proportions des nutriments sont les suivantes : protéines 2.5-60%, amidon 0-22%, lipides 1-18%, stérols 1%, minéraux 1% (Willmer 2011)

fleurs (jusqu'à 1000 !) pour nourrir une seule larve (Müller *et al.* 2006). Pour les abeilles domestiques (*Apis mellifera*), il a été estimé que 25 à 37.5 mg de pollen et 59.4 mg de sucres étaient nécessaires pour le développement d'une larve (Hrassnigg and Crailsheim 2005; Brodschneider and Crailsheim 2010). Pour le développement d'une colonie de 5 ouvrières de *Bombus terrestris*, la colonie requiert 6 g de pollen (soit 1 g de protéine) et 50 g de sucres et si on tient compte des besoins durant leur vie entière, la consommation de pollen est de 176 g (soit 31 g de protéines) et de 1186 g de sucres ; soit un ratio de 1 g de protéine pour approximativement 43 g de sucres (Rotheray *et al.* 2017). Cependant, les besoins diffèrent selon les espèces ; ainsi, une étude comparant le développement de colonies de *Bombus terrestris, B. hypnorum et B. pratorum* a montré que même avec des régimes alimentaires similaires, le développement de la colonie diffère selon l'efficience de la nutrition (calculée en fonction de la quantité de pollen/sirop consumé par g de larve produite). *Bombus terrestris* est l'espèce la plus performante (en terme de g de pollen par g de larve produite) et nécessite deux fois moins de pollen (1.71 g/g larves vs 3.93 g/g larves pour *B. hypnorum*) et six fois moins de sirop[3] (13.22 g/g larves vs 68.34 g/g larves pour *B. hypnorum*) pour produire la même masse de larves que *B. hypnorum* (Moerman *et al.* 2016).

La quantité et la qualité des ressources est déterminante pour le développement des insectes et des colonies. Ainsi, la concentration en protéines du pollen est corrélée positivement avec le développement des larves et la reproduction des adultes chez les abeilles domestiques, les bourdons ainsi que chez certaines abeilles solitaires (e.g. *Lasioglossum zephyrum).* Etant donné que les qualités de nectar et de pollen varient entre les espèces végétales, on peut supposer que les différentes espèces d'abeilles ont des exigences nutritionnelles qui leur sont spécifiques, rendant complexe l'analyse de leurs besoins. Actuellement, les besoins nutritionnels de nombreuses espèces d'abeilles solitaires restent inconnus (Woodard and Jha 2017); les études se sont concentrées jusqu' ici sur les besoins des abeilles domestiques ainsi que des bourdons (Brodschneider and Crailsheim 2010; Nicolson 2011; Vaudo *et al.* 2015; Moerman *et al.* 2016).

2.5. Choix de visites

Les insectes pollinisateurs sont amenés à choisir quelles fleurs ils vont visiter. Ce choix est multifactoriel et dépend, en plus des signaux et des ressources florales, des préférences innées, de la constance du choix et aussi des possibilités de choix (Fig. 3). La constance de choix est une tendance des pollinisateurs à visiter le même type de fleurs ou les fleurs d'une même espèce successivement, même si d'autres fleurs attractives sont présentes (Junker and Parachnowitsch 2015). Selon la théorie du choix optimal (MacArthur and Pianka 1966), les pollinisateurs essaient de maximiser leur bénéfice (quantité de ressources florales récoltées) par rapport au coût de visite (facilité d'accès aux ressources, déplacement entre fleurs, temps passé sur la fleur). Le vol est énergétiquement coûteux, et le bénéfice associé à chaque visite est difficile à prévoir, puisque les quantités de pollen

[3] solution remplaçant le nectar dans le développement de micro-colonies

et de nectar varient dans le temps et l'espace (Goulson 2010). Si une fleur contient peu ou pas de récompense, la visite représente une perte de temps et d'énergie. Par conséquent, les pollinisateurs ont appris à reconnaître les fleurs qui offrent de grandes récompenses (Jones *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2016). Cependant, les quantités de ressources florales ne déterminent pas à elles seules le choix de visite. Les pollinisateurs montrent aussi des préférences innées pour certains traits floraux ; les préférences innées sont liées à des biais sensoriels qui peuvent concerner la forme d'une fleur, son odeur ou sa couleur (Chittka and Raine 2006; Junker and Parachnowitsch 2015; Sprayberry 2018).

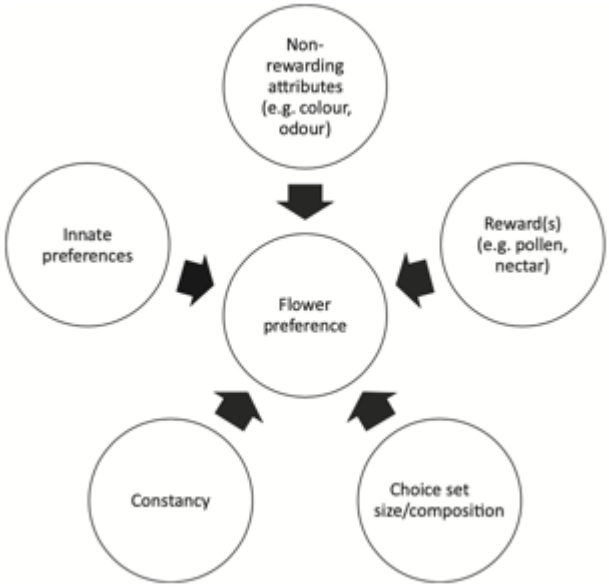


Figure 3 : Schéma conceptuel reprenant les différents paramètres influençant le choix de visites (Latty and Trueblood 2020).

Chaque paramètre peut s'influencer mutuellement. Par exemple, Austin *et al.* (2019) ont montré que les choix de visites de *Bombus impatiens* sont plus constants quand il fait face à un choix de 4 types de fleurs par rapport à un choix où seuls 2 types de fleurs sont accessibles. Le degré de constance est donc influencé par la composition florale.

2.6. Réseaux d'interaction entre plantes et pollinisateurs

L'ensemble des visites réalisées par des pollinisateurs dans un biotope donné peut être représenté par un réseau d'interactions qui permet de visualiser et d'analyser les liens qui existent entre les types de visiteurs et les fleurs qu'ils visitent (réseaux bipartites, représentant deux communautés, Fig. 4). Ces analyses sont utiles pour comprendre comment les communautés de plantes et de pollinisateurs interagissent et permettent de suivre un ensemble d'interactions (Memmott 2009; Blüthgen 2010). De nombreuses métriques sont issues de ces réseaux et se concentrent par exemple sur la spécialisation

des espèces, pour expliquer si les interactions se produisent de manière aléatoire ou non, ou encore sur la connectance, qui est la proportion réalisée (observée) des liens possibles au niveau des interactions (Dunne *et al.* 2002). Une valeur élevée de connectance reflète une forte généralisation des espèces dans le réseau. Une métrique seule n'est pas indicative, mais la comparaison des métriques issues d'un même réseau en fonction d'une perturbation peut aider à comprendre la façon dont le réseau évolue (Blüthgen 2010). Les réseaux d'interactions plantes-pollinisateurs peuvent être plus intéressants pour comprendre l'évolution des populations qu'une liste d'espèces illustrant simplement la diversité des espèces ; ces réseaux et leurs métriques pouvant même servir d'indicateur de la qualité de l'environnement (Soares *et al.* 2017).

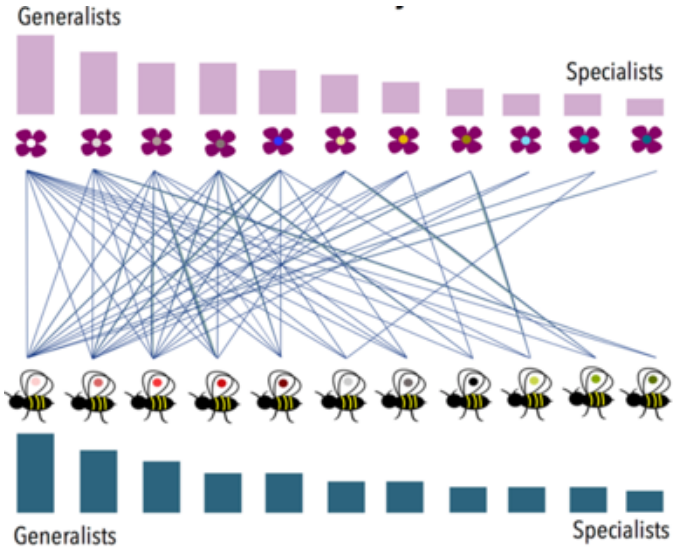


Figure 4 : Schéma conceptuel illustrant les différences d'interactions entre espèces généraliste et spécialiste (Gracia-Lázaro *et al.* 2018).

2.7. Perspectives évolutives

Les pollinisateurs exercent une pression de sélection forte sur les traits floraux (Schiestl and Johnson 2013). Cette pression de sélection a constitué un des facteurs importants de diversification des formes florales, agissant en parallèle d'autres pressions de sélections comme les conditions abiotiques ou encore la prédation (Galen 1999). Cette sélection est d'autant plus importante que la plante nécessite une fécondation croisée (allopollinisation) et qu'elle dépend d'un seul un type de pollinisateur (Fenster *et al.* 2004; Ollerton *et al.* 2007). Etant donné l'influence réciproque d'une espèce sur l'autre, cela a mené à des co-évolutions entre les plantes et les pollinisateurs (Thompson and Cunningham 2002). Dans certains cas, la coévolution a mené à une spécialisation importante, qui a permis d'augmenter l'efficacité pollinisatrice, mais aussi le niveau de dépendance de la plante à un pollinisateur particulier (Johnson and Steiner 2000).

3. Pressions sur les écosystèmes

3.1. Crise de la biodiversité

La biodiversité décline à un rythme sans précédent à l'échelle mondiale, entrainant l'extinction ou la disparition de nombreuses espèces sur terre (IPBES 2019) ; les disparitions d'espèces de vertébrés ont été multipliées par 100 depuis 1900, un taux qui n'a plus été atteint depuis 66 millions années (correspondant à l'extinction du Crétacé-Paléogène, Ceballos *et al.* 2015). Les principales causes avancées sont la disparition, la fragmentation et la détérioration des biotopes et écosystèmes, les invasions biologiques et la surexploitation des ressources (Sala 2000).

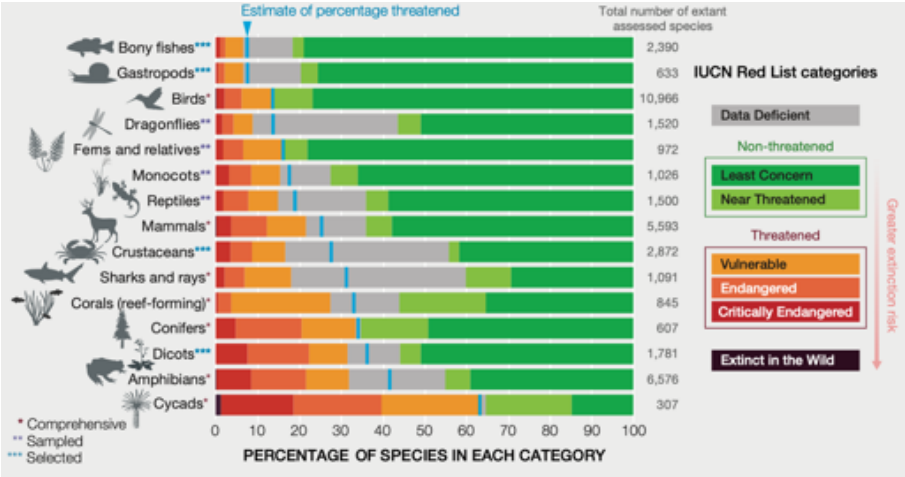


Figure 5 : Pourcentage d'espèces menacées d'extinction dans les groupes taxonomiques qui ont fait l'objet d'une évaluation complète, ou d'une approche "par échantillonnage", ou pour lesquels des sous-ensembles sélectionnés ont été évalués par la Liste rouge des espèces menacées de l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN). Les différentes catégories correspondent à des niveaux de menaces d'extinction d'espèces: espèces éteintes (noir), espèces en danger critique d'extinction, en danger, vulnérables (rouge à orange, regroupées en « espèces menacées »), espèces quasi-menacées ou de préoccupation mineure (vert, regroupées en « espèces non menacées »), espèces pour lesquelles les données sont insuffisantes (gris). La classification parmi ces catégories se fait via 5 critères quantitatifs lié à l'espèce : taux de déclin, population totale, zone d'occurrence et d'occupation, degré de peuplement et fragmentation de la répartition. Les groupes sont classés en fonction de la meilleure estimation du pourcentage d'espèces existantes considérées comme menacées (indiquées par les lignes bleues verticales), en supposant que les espèces pour lesquelles les données sont insuffisantes sont aussi menacées que les espèces pour lesquelles les données ne sont pas insuffisantes (extrait de IPBES 2019).

Parmi les Angiospermes, on estime qu'environ 35% de dicotylédones et 20% de monocotylédones sont menacées d'extinction (Fig. 5). A travers le monde, plus de 40% des espèces d'insectes sont menacées d'extinction durant les prochaines décennies (Sánchez-Bayo and Wyckhuys 2019). Une étude réalisée en Allemagne a montré que la

biomasse des arthropodes aurait diminué de 67% et que 34% des espèces auraient disparu des prairies (Seibold *et al.* 2019).

3.2. Menace sur la pollinisation

La pollinisation est identifiée comme un des 15 services écosystémiques en déclin par le *Millenium Ecosystem Assessment* (2005) suite à la diminution importante des populations d'insectes pollinisateurs (IPBES 2016). En Europe, 9 % des espèces d'abeilles et 23% de toutes les espèces pollinisatrices sont considérées comme menacées (Nieto *et al.* 2014).

Les causes du déclin des pollinisateurs sont multiples : la perte ou fragmentation des biotopes (intensification de l'utilisation du sol), l'homogénéisation des paysages agricoles, l'usage des pesticides, les changements climatiques et les invasions biologiques - qui incluent en particulier certains parasites et pathogènes - sont les principales causes identifiées (Potts *et al.* 2010; Goulson *et al.* 2015; Sánchez-Bayo and Wyckhuys 2019; Soroye *et al.* 2020). Il est essentiel pour les insectes de disposer de sites de reproduction et de nidification, mais également de disposer des ressources florales durant tout leur cycle de développement (Brodschneider and Crailsheim 2010; Woodard 2017). La majorité des causes expliquant le déclin des pollinisateurs concernent directement le déclin et la modification de la disponibilité de ces ressources florales à l'échelle du paysage (Potts *et al.* 2010; Goulson *et al.* 2015; Settele *et al.* 2016; Brown *et al.* 2016; Woodard and Jha 2017). La disponibilité en ressources florales fait partie intégrante de la qualité de l'habitat (Carvell *et al.* 2017).

Le rôle des insectes pollinisateurs dans le maintien des communautés végétales est essentiel. La perte de pollinisateurs entraine une diminution du transfert de pollen pour les espèces entomophiles et une réduction de leur succès reproducteur, c'est-à-dire de la mise à fruits et à graines (Carvell *et al.* 2006; Powney *et al.* 2019). Des déclins parallèles d'insectes pollinisateurs et de plantes entomophiles sont ainsi observés aux Pays-Bas et au Royaume-Uni, en particulier pour les espèces oligolectiques (Biesmeijer *et al.* 2006). Même si la disparition d'une espèce ne déclenche pas d'extinctions ultérieures, elle peut provoquer des effets en cascade au niveau du réseau d'interactions, vu la complexité des interactions écologiques (Pires *et al.* 2020). Une interaction généraliste (un pollinisateur visite différentes espèces végétales ou une espèce végétale est visitée par différents pollinisateurs) peut être maintenue, si le pollinisateur modifie les espèces visitées ou si l'espèce végétale attire d'autres pollinisateurs (Willmer 2011; Bartomeus *et al.* 2011). Les interactions spécialistes sont, elles, plus vulnérables aux changements (Schweiger *et al.* 2010; Schleuning *et al.* 2016; EEA 2017; Powney *et al.* 2019; Bogusch *et al.* 2020). Il a été montré en Suisse que l'abondance des plantes visitées par peu de groupes d'insectes pollinisateurs diminue plus fortement que l'abondance des espèces visitées par de nombreux groupes d'insectes pollinisateurs (Abrahamczyk *et al.* 2020). Cette étude montre aussi une diminution de la diversité des interactions (homogénéisation des assemblages) dans tous les types de végétation, à l'exception des zones rudérales. De nombreuses études s'accordent sur le fait qu'on tend vers une généralisation des réseaux

d'interactions, en favorisant les espèces généralistes capables de mieux s'adapter aux changements (Waser *et al.* 1996; Gérard *et al.* 2020; Fisogni *et al.* 2021).

Bien que ces dernières années, l'attention ait été portée sur les espèces en déclin, certaines espèces sont au contraire en expansion et profitent de ces changements globaux pour étendre leur aire de répartition (Ghisbain *et al.* 2021). Les caractéristiques qui déterminent le plus le maintien ou l'expansion de certaines espèces sont une mobilité suffisante de l'espèce et une résistance et adaptation à des climats plus chauds. Par ailleurs, la flexibilité aussi bien dans les sites de nidification que dans les ressources florales collectées (espèces généralistes) sont d'autres caractéristiques généralement observées pour les espèces en expansion (Ghisbain *et al.* 2021).

Le déclin de certaines espèces et, en parallèle, l'expansion d'autres espèces vont modifier les réseaux d'interactions entre plantes et pollinisateurs et peuvent potentiellement augmenter le risque d'extinction tant d'espèces de pollinisateurs spécialistes que de plantes entomophiles.

3.3. Evolution du climat et projections futures

Les changements climatiques ont un impact mondial majeur et en particulier sur les écosystèmes naturels (Sala 2000; Feehan *et al.* 2009; Bellard *et al.* 2012; IPBES 2019). Selon le rapport spécial du GIEC de 2018, il est « extrêmement probable » que l'influence de l'homme soit la cause principale du réchauffement climatique observé depuis la moitié du 20ème siècle (IPCC 2018). Le réchauffement est très vraisemblablement la conséquence de l'augmentation anthropique des gaz à effet de serre (CO_2, CH_4 et N_2O) ; entre 2000 et 2010, ils ont augmenté de 2.2 % chaque année. La concentration moyenne du CO_2 dans l'atmosphère est d'environ 400 ppm, ce qui est 40% plus élevé par rapport à la période pré-industrielle (1850-1899). En Europe, l'augmentation moyenne des températures est de 1.5°C (2009-2018) par rapport à la période pré-industrielle. Suivant les différents scénarios du GIEC[4], cette augmentation variera de 0.3 à 1.7°C pour le scénario le plus optimiste concernant les réductions de gaz à effets de serre (RCP2.5) et de 2.6 à 4.8°C pour le scénario le plus pessimiste d'ici 2100, par rapport aux températures observées en 1850 (Fig. 6). L'augmentation des températures n'est pas uniforme à la surface du globe, les scénarios s'accordent sur le fait que l'Arctique se réchauffera plus rapidement et que l'augmentation de température sera plus importante à la surface des continents que des océans (EEA 2017).

[4] Les scénarios RCP (*Representative Concertation Pathway)* sont des scénarios établis par le GIEC d'évolution des concentrations de gaz à effets de serre, traduit en terme de forçage radiatif (plus la valeur du forçage radiatif est élevée, plus le système terre-atmosphère gagne en énergie et se réchauffe). Le scénario RCP2.6 correspond à +2,6W/m² pour l'année 2100, le RCP4.5 à + 4,5W/m² et le RCP8.5 à +8,5W/m². Ce dernier, le plus pessimiste, implique que nous continuons à vivre comme aujourd'hui, sans politique pour limiter le réchauffement climatique. Actuellement, les observations montrent que nous suivons une trajectoire entre le RCP4.5 et RCP8.5 (Jacob *et al.* 2014; EEA 2017).

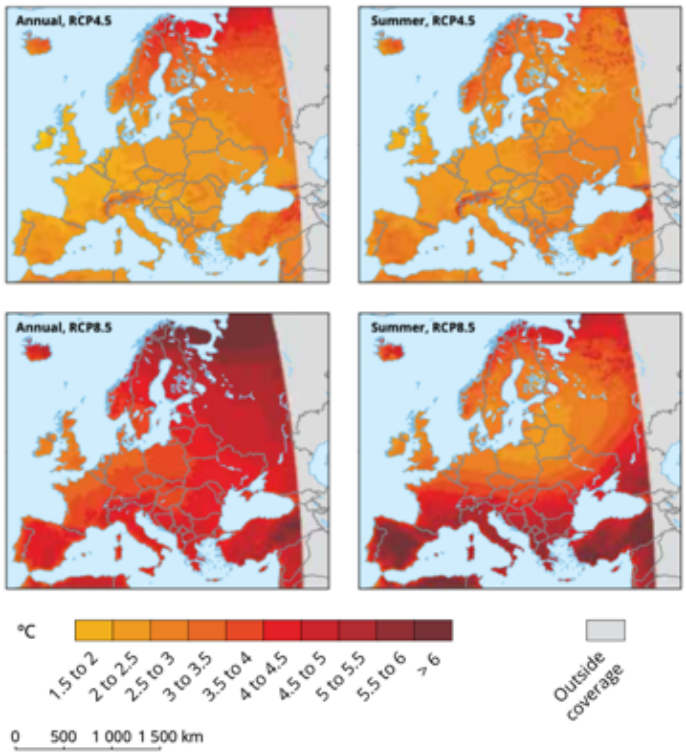


Figure 6 : Projection de l'augmentation moyenne de température annuelle (à gauche) et estivale (à droite) pour la période 2071-2100 par rapport à la période de référence 1971-2000 et suivant deux scénarios du GIEC, RCP 4.5 et RCP 8.5 (EEA, 2017).

Les vagues de chaleur sont amenées à être plus fréquentes et à durer plus longtemps en Europe (Fig. 7). Les modifications du régime de précipitation varient suivant les différentes régions d'Europe et suivant les saisons (Dai 2013; EEA 2017 ; Fig. 8). Globalement, les précipitations annuelles tendent à augmenter dans la plupart des régions au nord de l'Europe, alors qu'elles diminuent dans les régions du sud de l'Europe. Les périodes de déficit hydrique vont également augmenter dans le Sud de l'Europe et dans les zones centrales (Spinoni *et al.* 2018).

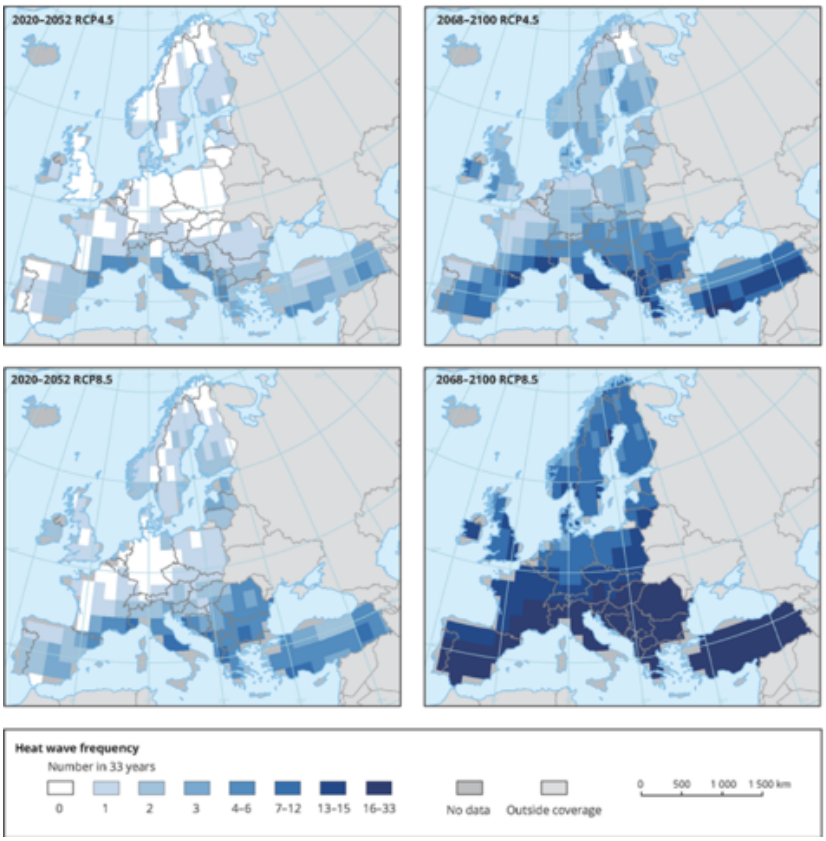


Figure 7 : Projection de la fréquence des vagues de chaleur (en nombre de fois par 33 ans) pour la période 2020-2052 et 2068-2100 suivant deux scénarios du GIEC, RCP 4.5 et RCP 8.5 (EEA, 2017).

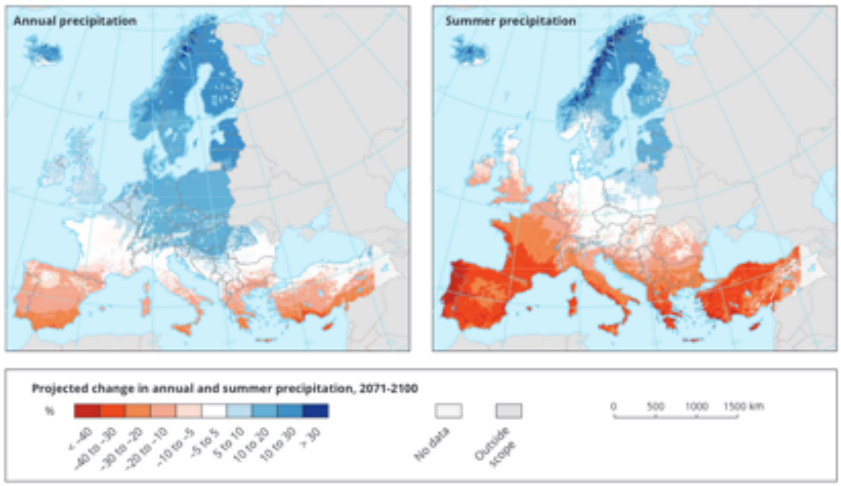


Figure 8 : Changements projetés de précipitations annuelles et estivales (%) dans la période 2071-2100 par rapport à la période 1971-2000 suivant le scénario RCP8.5 (EEA 2017).

Même si des mesures drastiques sont mises en place, les effets de cette augmentation de gaz à effet de serre impactera les écosystèmes sur le très long terme. A côté de l'augmentation de température, d'autres effets sont observés comme une montée des eaux des océans et une augmentation des événements extrêmes (sécheresses, inondations, tempêtes, feux).

Etant donné la diversité des effets des changements climatiques et leur interaction, la réponse des espèces à ces modifications est complexe (Reyer *et al.* 2013). Suivant les écosystèmes, leur sensibilité par rapport aux variables climatiques peut être différente (Settele *et al.* 2014). En particulier, en région tempérée, les changements climatiques induisent de nouvelles contraintes pour les écosystèmes, contraintes qu'ils ne subissaient pas auparavant ; par exemple, l'augmentation de la fréquence des sécheresses affecte de nombreux écosystèmes en Europe tempérée pour lesquels les précipitations étaient habituellement régulièrement réparties au cours de l'année (Spinoni *et al.* 2018). Tous les niveaux de la biodiversité sont affectés par ces changements, depuis l'espèce jusqu'au biome. Enfin, bien que les effets graduels des changements climatiques semblent de mieux en mieux caractérisés, les effets d'évènements plus extrêmes telles que des canicules ou des sécheresses restent moins étudiés (Brown *et al.* 2016).

3.4. Adaptation des plantes et des insectes pollinisateurs à ces contraintes

Chaque espèce peut répondre à une contrainte externe en changeant suivant 3 niveaux, comme définis par Bellard *et al.* (2012) : (1) temporel (phénologie de l'espèce), (2) spatial (distribution), (3) individuel (physiologie). Les espèces peuvent aussi ne pas être capables de s'adapter et ne pas survivre (McCarty 2001). Ces changements auront des répercussions sur les dynamiques de populations, sur la structure des communautés et sur les services écosystémiques et, à terme, sur l'évolution des interactions plantes-pollinisateurs (Hegland *et al.* 2009; Schweiger *et al.* 2010; Ovaskainen *et al.* 2013). Les changements climatiques agissent sur cette dynamique évolutive et des facteurs abiotiques tels que la température, la disponibilité en eau, amènent une pression de sélection supplémentaire.

Les relations mutualistes, en particulier les relations plantes-pollinisateurs, sont menacées par ces changements (Cohen *et al.* 2018). La rupture de ces interactions peut avoir des répercussions plus larges et accélérer d'autant plus le déclin de biodiversité déjà observé (Kiers *et al.* 2010).

3.4.1. Modifications phénologiques

Les changements au niveau de la phénologie ont été parmi les premiers étudiés et constituent un outil clé pour suivre les effets des changements climatiques au niveau des écosystèmes (Menzel *et al.* 2006; Reyer *et al.* 2013; Cohen *et al.* 2018). La température joue un rôle important sur le développement des insectes et la floraison des plantes (Gérard *et al.* 2020). De nombreux changements phénologiques ont été rapportés à la fois pour

les plantes et les pollinisateurs (Hegland *et al.* 2009; Gérard *et al.* 2020). Les températures plus chaudes avançaient la floraison des plantes par rapport à l'émergence des insectes dans une étude concernant *Pulsatilla vulgaris* et *Osmia cornuta* et *Osmia bicornis*, ce qui peut impacter négativement la reproduction des plantes (Kehrberger and Holzschuh 2019). Cependant, dans une autre étude analysant les décalages phénologiques entre les papillons et leurs plantes hôtes, la température avançait l'émergence des papillons par rapport à la floraison de leurs plantes hôtes, ce qui augmente l'asynchronicité (Parmesan 2007). A l'échelle de la communauté, ces changements diminuent la redondance fonctionnelle et la complémentarité au niveau des interactions entre les plantes et leurs pollinisateurs, ce qui peut altérer le service de pollinisation (Duchenne *et al.* 2020). Néanmoins, certaines études montrent que ces décalages phénologiques devraient avoir un impact limité sur les écosystèmes, en particulier pour les espèces généralistes (Rafferty and Ives 2011; Bartomeus *et al.* 2011; Ovaskainen *et al.* 2013; Benadi *et al.* 2014).

3.4.2. Modification de l'aire de répartition géographique

La modification de la distribution des espèces concerne aussi bien les plantes que les pollinisateurs. Contrairement aux changements phénologiques qui peuvent être assez facilement liés aux changements climatiques, les changements de distribution peuvent être provoqués par d'autres facteurs comme par exemple, la modification d'occupation du sol, la destruction ou la fragmentation des biotopes, ce qui complique la distinction entre ces différentes causes (Settele *et al.* 2016). Les aires de répartition des plantes ont tendance à migrer vers le nord et vers des altitudes plus élevées suite à l'augmentation des températures (Parmesan and Hanley 2015). Les bourdons, qui constituent un groupe bien étudié pour le déplacement des aires de répartition parmi les insectes pollinisateurs, se sont aussi déplacés vers les latitudes nord et vers des altitudes plus élevées au cours du siècle dernier, puisque ce sont des insectes adaptés plutôt aux climats froids (Kerr *et al.* 2015; Pyke *et al.* 2016). Même si les espèces peuvent étendre leur aire de répartition et se déplacer suite à des modifications climatiques, le taux de déplacement spatial n'est pas toujours suffisant pour suivre la modification du climat, comme l'ont montré Bedford *et al.* (2012) pour des espèces de papillons du nord du Canada. Peu d'études ont observé un déplacement de l'aire de répartition simultané dans les communautés de plantes-pollinisateurs (Gérard *et al.* 2020).

3.4.3. Modifications intra-spécifiques

La troisième dimension de l'évolution due aux changements climatiques concerne la modification à l'échelle individuelle en termes de physiologie et/ou de morphologie. Tant les plantes que les pollinisateurs vont adapter leur physiologie à ces nouvelles contraintes climatiques. La littérature concernant les impacts du changement climatique sur la physiologie des plantes et leur croissance végétative est très abondante; la floraison et la reproduction, en particulier des plantes entomophiles, restent toutefois moins étudiées (Parmesan and Hanley 2015).

Cette thématique sera particulièrement explorée dans cette thèse en tenant compte des répercussions sur le comportement des pollinisateurs. Dans la suite de l'introduction, nous allons nous intéresser particulièrement à l'impact des sécheresses et des hausses de température sur les interactions plantes-pollinisateurs à l'échelle individuelle.

Notion de plasticité individuelle et fitness

Le génotype correspond à l'ensemble des gènes d'un individu ; le phénotype d'un individu correspond à ce qui est vu, observé ou mesuré sur cet individu dans les conditions de milieu où il est présent et à un niveau d'observation donné (Gallais 2018). Pour un caractère donné, le phénotype est le résultat de l'interaction entre le génotype et le milieu (Gallais 2018). La plasticité phénotypique décrit la capacité d'un génotype donné à présenter des phénotypes différents selon les conditions environnementales (Nicotra *et al.* 2010; Gallais 2018; Shaar-Moshe *et al.* 2019) ; cette plasticité est une caractéristique d'un trait donné en réponse à un stimulus environnemental donné (Fig. 9A). Plusieurs traits phénotypiques ont montré une plasticité en réponse aux changements climatiques et ont été décrits pour des espèces végétales; par exemple, une altération du développement des feuilles (Estiarte & Peñuelas, 2015), des floraisons plus précoces (Cook, Wolkovich, & Parmesan, 2012 ; Ovaskainen et al., 2013) et des changements des taux de croissance ou de la productivité globale (Medeiros & Ward, 2013 ; Norby & Zak, 2011). Chez les insectes, la taille des ailes montre aussi une plasticité importante en fonction des stress (Gerard *et al.* 2018). Certaines réponses apportent un avantage en termes de fitness et sont adaptatives, tandis que d'autres sont des réponses aux limitations des ressources et ne sont pas adaptatives (Fig. 9B; Nicotra *et al.* 2010; Shaar-Moshe *et al.* 2019). Des mécanismes similaires sont aussi observés chez les insectes pollinisateurs. L'évolution est définie comme un changement de la fréquence des allèles entraînant une modification du phénotype dans une population (Conner and Hartl 2004; Franks *et al.* 2014)

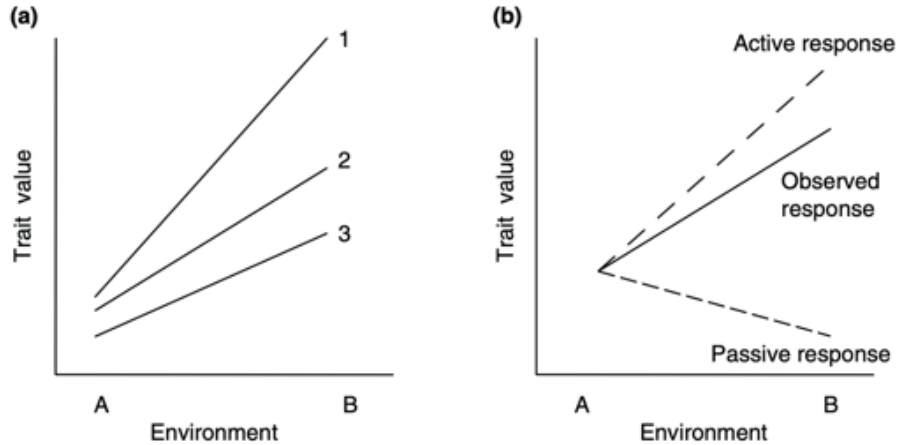


Figure 9 : Réponses des traits à deux environnements (A-B) ; (a) un exemple de plasticité des traits pour 3 espèces (1-3) : 1 montre la plus grande plasticité phénotypique et 3 la plus faible ; (b) une illustration d'une réponse observée pour un trait en tant que résultat d'une réponse active

(adaptative, par exemple, augmentation du trait due à un changement d'allocation des ressources pour compenser la perte de fitness dans l'environnement B) et d'une réponse passive (non adaptative, par exemple, diminution du trait due à une limitation des ressources). Adapté de Nicotra *et al.* (2010).

4. Effets des sécheresses et des hausses de température sur les plantes

4.1. Définition des stress et stratégies de réponses des plantes

4.1.1. Stress abiotiques

Bien qu'il n'y ait pas de définition communément acceptée d'un « stress » (Thalmann and Santelia 2017), nous considérons ici que les stress abiotiques incluent tous les facteurs environnementaux qui peuvent affecter négativement la croissance et la productivité des plantes. Parce que les plantes sont des êtres vivants sessiles, elles sont continuellement exposées à un large éventail de stress abiotiques (Suzuki *et al.* 2014; Yamori *et al.* 2014). Ces stress entraînent un panel de réactions chez les plantes, notamment des changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui se traduisent, dans certains cas, par des réactions similaires (Zhang *et al.* 2017). Par exemple, la sécheresse, la forte salinité et le froid peuvent tous résulter en une déshydratation physiologique au niveau cellulaire. La réponse au stress est complexe et implique plusieurs facteurs, notamment la signalisation, les facteurs de transcription, les hormones et les métabolites secondaires (Taiz *et al.* 2015; Lamaoui *et al.* 2018). Dans le contexte des changements climatiques, les plantes rencontrent des combinaisons de stress abiotiques et les réponses peuvent être négatives ou positives en fonction des interactions entre les stress (Fig. 10). La majorité des combinaisons de stress a un impact négatif plus important que chaque stress appliqué individuellement (Zandalinas *et al.* 2018). La combinaison de la sécheresse et de hausses de températures est particulièrement délétère pour les plantes, bien que la réponse dépende de l'intensité des deux stress (Orians *et al.* 2019).

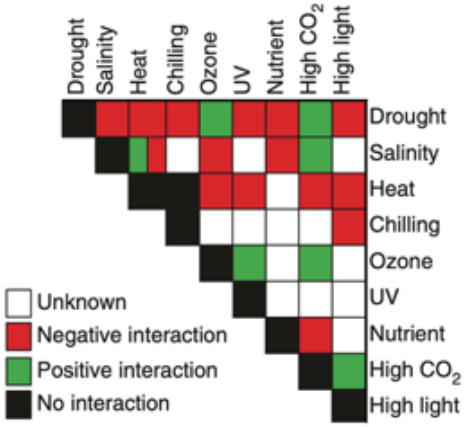


Figure 10 : Interactions positives, négatives, inexistantes ou inconnues lors de la combinaison de deux stress abiotiques (Zandalinas *et al.* 2018).

Les plantes utilisent différentes stratégies pour résister aux stress abiotiques, notamment l'échappement (accélération du cycle de vie) et la résistance (maintien du développement de la plante même sous stress, qui inclut les stratégies d'évitement et de tolérance, Shaar-Moshe *et al.* 2019). L'évitement est une stratégie qui permet de modifier ou de stopper l'effet du stress par des changements morphologiques ou physiologiques comme, par exemple, la fermeture des stomates en réponse au stress hydrique. La tolérance concerne, par contre, une stratégie où les plantes maintiennent un fonctionnement normal, malgré le stress, via des ajustements au niveau moléculaire comme, par exemple, un ajustement osmotique en réponse au stress hydrique (Taiz *et al.* 2015; Khan *et al.* 2020). Ces stratégies ne sont pas exclusives et permettent aux plantes de développer aussi des adaptations phénotypiques (Shavrukov *et al.* 2017; Bouzid *et al.* 2019).

4.1.2. Focus sur les hausses de température et les sécheresses

Parmi tous les stress abiotiques supportés par les plantes dans le contexte des changements climatiques, deux ont retenu notre attention dans le cadre de cette thèse de doctorat : le stress thermique et le stress hydrique et leur combinaison, pour trois raisons. Premièrement, ces deux stress sont fréquents et peut-être les deux facteurs environnementaux les plus importants limitant la croissance et le rendement des cultures dans le monde et se produisant simultanément dans les écosystèmes (Rizhsky *et al.* 2002; Mittler 2006; Prasad *et al.* 2008; Vile *et al.* 2012; Suzuki *et al.* 2014; Fahad *et al.* 2017). Les conséquences négatives de la combinaison de ces stress sont nettement plus importantes par rapport à la conséquence de chaque stress lorsqu'ils sont appliqués individuellement (Mittler 2006; Zandalinas *et al.* 2018). Deuxièmement, l'augmentation des températures moyennes mondiales et la fréquence des sécheresses devraient constituer de nouvelles contraintes pour les écosystèmes des zones tempérées dans les prochaines années, selon les prévisions climatiques (IPCC 2018; Spinoni *et al.* 2018). Troisièmement, les périodes de déficit hydrique se produisent généralement au printemps et en été, ce qui correspond

à la période de floraison et à l'activité de recherche de nourriture des pollinisateurs (Settele *et al.* 2016).

Pour les plantes, un stress hydrique se produit lorsqu'un déséquilibre existe entre le flux d'évapotranspiration et l'apport d'eau du sol, provoquant un déficit hydrique pour les plantes (Taiz *et al.* 2015). La réduction du contenu en eau peut se marquer au niveau du sol mais aussi de l'air. Les définitions et les protocoles mesurant les effets des stress hydriques sont très variés, ce qui complexifie la comparaison d'études entre elles (Crausbay *et al.* 2017; Slette *et al.* 2019). Au niveau du sol, on estime qu'un contenu en eau inférieur à 50% peut représenter un déficit hydrique sévère (Chai *et al.* 2016). Un contenu en eau relatif en-dessous de 70% dans les tissus végétatifs est généralement considéré comme un « stress hydrique », induisant la synthèse d'acide abscissique et le flétrissement de la plante (Babu *et al.* 1999; Pacini and Dolferus 2019).

Le stress thermique est défini comme l'augmentation de la température du sol et de l'air au-delà d'un niveau seuil pendant une durée minimale telle que des dommages permanents à la croissance et au développement des plantes se produisent (Lipiec *et al.* 2013; Lamaoui *et al.* 2018). L'ensemble des processus physiologiques est sensible à la température (Dusenge *et al.* 2019). L'augmentation des températures moyennes est différente des chocs thermiques, qui sont une augmentation très rapide de la température pendant plusieurs heures/jours et qui entraînent une réponse différente au stress par rapport à une longue augmentation des températures moyennes. L'objet de la thèse concerne des augmentations estimées réalistes de températures (+3 °C et + 6 °C) appliqués durant plusieurs semaines ; nous n'étudierons pas dans ce cadre l'effet de chocs thermiques, d'évènements caniculaires, ou d'augmentations brusques de la température (voir par exemple, Zhang *et al.* 2017). Le choix de ces températures a été basé sur les scénarios climatiques émis par le GIEC (IPCC 2018) tout en tenant compte des capacités techniques des chambres de cultures à notre disposition à l'université.

Le stress thermique et le stress hydrique peuvent tous deux varier en termes d'intensité et de durée. Leurs conséquences pour les plantes dépendent de la phase de croissance pendant laquelle celles-ci sont exposées aux stress ainsi que de leur tolérance face aux stress (Wahid *et al.* 2007; Zinn *et al.* 2010; Gray and Brady 2016).

4.2. Conséquences sur la croissance végétative

Toutes les phases de développement de la plante peuvent être altérées par les stress abiotiques. Appliqués au début du cycle de vie, tant les hausses de température qu'un stress hydrique réduisent les capacités de germination des graines et le développement des plantules (Fahad *et al.* 2017).

Par la suite, le stress hydrique en limitant la division et l' élongation cellulaire suite à la perte de turgescence des cellules (Gray and Brady 2016) limite la croissance des plantes. La réduction de la croissance conduit à une diminution des poids frais et sec (Fahad *et al.*

2017; Hamann *et al.* 2018). L'augmentation de la température, quant à elle, peut stimuler la croissance de la plante jusqu'à une certaine température optimale, dépendante de l'espèce, avant de devenir stressante pour la plante (Hao *et al.* 2019). Une fois ce seuil dépassé, la température peut causer une réduction de croissance (Wahid *et al.* 2007). Ce seuil de température est généralement supérieur pour la phase végétative par rapport à la phase reproductive (Hatfield and Prueger 2015; Korres *et al.* 2016, Fig. 11).

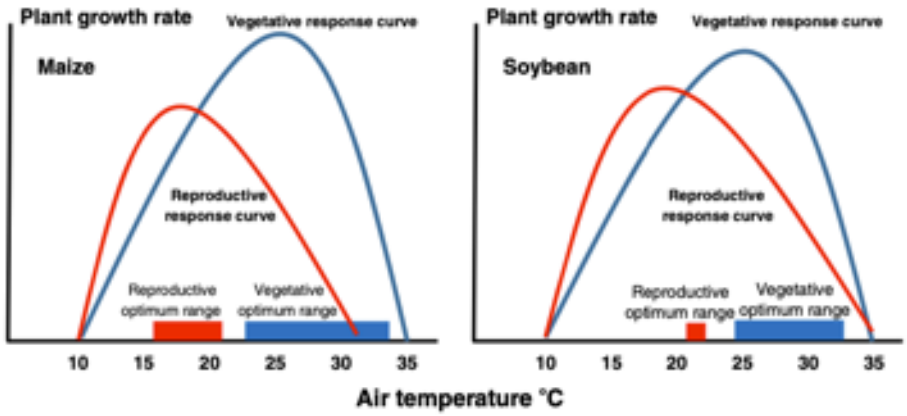


Figure 11 : Taux de croissance du maïs et du soja durant les phases végétative et reproductive en fonction de la température (Korres *et al.* 2016).

Dans des conditions de stress hydrique, des changements morphologiques peuvent altérer la capacité photosynthétique des feuilles : (i) des changements d'orientation des feuilles, enroulement ou flétrissement (Fig. 12B), (ii) une réduction de l'initiation des nouvelles feuilles (Fig. 12C), et (iii) une sénescence précoce ou atypique des feuilles (Fig. 12D, Xu and Huang 2007; Feller 2016). La sénescence atypique implique une dégradation incomplète de la chlorophylle et des protéines, et engendre une remobilisation suboptimale de l'azote (Feller 2016).

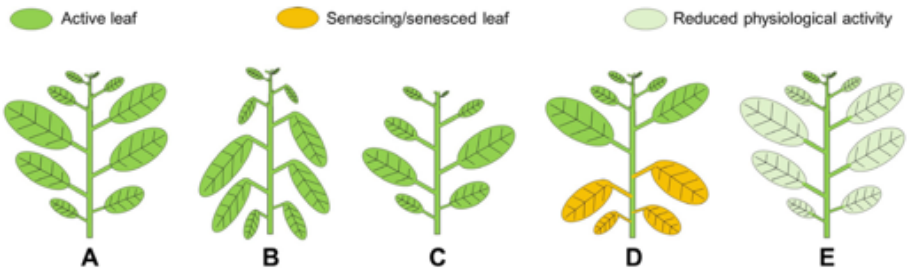


Figure 12 : Schéma des effets du stress hydrique sur la capacité photosynthétique des feuilles. A : plante contrôle ; B : diminution de capacité dû à l'orientation ou au flétrissement des feuilles ; C: diminution de capacité suite à la réduction d'initiation de nouvelles feuilles ; D : sénescence foliaire atypique ; E : diminution de capacité suite à des perturbations physiologiques au niveau des feuilles (Feller 2016).

En ce qui concerne l'anatomie des feuilles, l'augmentation des températures peut favoriser le développement de feuilles plus fines avec une surface foliaire plus élevée alors

que les feuilles développées sous stress hydrique ont des cellules plus petites et une densité stomatique plus élevée (Lamaoui *et al.* 2018). La densité stomatique est corrélée négativement avec la taille des stomates ; ce qui implique qu'à une densité plus élevée, les cellules de garde des stomates sont alors plus petites, ce qui entraine une moindre régulation de l'ouverture des stomates (Lawson and Blatt 2014).

Le stress hydrique réduit la croissance aérienne au profit de la croissance racinaire (Khan *et al.* 2010; Gray and Brady 2016).

4.3. Modifications des processus physiologiques clés

Les réponses des plantes au stress hydrique et à l'augmentation de la température peuvent être communes ou spécifiques (Pandey *et al.* 2015). Ces réponses sont détaillées dans les paragraphes suivants. Cette section est divisée en termes d'effets sur (i) les relations hydriques et nutritives, (ii) la photosynthèse et (iii) les dommages oxydatifs.

4.3.1. Relations hydriques et nutritives

La régulation des stomates des feuilles est un phénomène clé, vital à la fois pour la prévention de la dessiccation et l'acquisition de CO_2 (Ashraf and Harris 2013; Lawson and Blatt 2014). L'augmentation des températures et le stress hydrique affectent différemment les caractéristiques des stomates. Alors que les stomates restent ouverts en réponse à une hausse de température afin de maintenir la transpiration et diminuer la température des feuilles, ils sont généralement fermés en réaction à un stress hydrique pour éviter la perte d'eau. Les réponses stomatiques à la combinaison du stress hydrique et de l'augmentation des températures représentent une situation difficile dans laquelle les plantes doivent trouver un équilibre entre la prévention des pertes d'eau et la protection des feuilles contre des températures trop élevées (Zandalinas *et al.* 2018). La diminution du taux de photosynthèse dans des conditions de stress est en partie attribuée à cette fermeture des stomates, qui diminue la conductance stomatique (Rizhsky *et al.* 2002; Ashraf and Harris 2013). La diminution de la conductance stomatique est couramment observée comme une réponse à la combinaison d'un stress hydrique et d'une augmentation de la température (Rizhsky *et al.* 2004; Geraci *et al.* 2019). Le stress le plus sévère semble déterminer la réponse physiologique de la plante (Pandey *et al.* 2015).

Comment mesurer la conductance stomatique ?

La conductance stomatique est une mesure des pertes de vapeur d'eau à travers les stomates. L'appareil permettant de mesurer ce paramètre dans le cadre de cette thèse est un poromètre à diffusion dynamique de la feuille, qui mesure la conductance de diffusion en comparant le taux précis d'humidification en plaçant une feuille dans une pince comprenant une cuvette aux lectures obtenues avec une plaque d'étalonnage. En pratique, la feuille est serrée dans la cuvette à l'intérieur de laquelle de l'air sec est insufflé. La transpiration de la feuille et la diffusion de vapeur vont augmenter l'humidité relative dans la cuvette ; le poromètre mesure le temps d'augmentation de l'humidité relative.

Grâce à la plaque d'étalonnage, la relation entre ce temps et la conductance stomatique est connue.

D'autres adaptations des plantes sont observées en réponse au stress thermique et hydrique, comme l'ajustement de l'orientation des feuilles (augmentation de l'angle d'insertion des feuilles) ou la variation de la densité stomatique (Hao *et al.* 2019). Pour *Arabidopsis thaliana*, Vile *et al.* (2012) ont observé que si la sécheresse tend à augmenter la densité des stomates, le stress thermique tend à la diminuer. En cas de combinaison, la densité stomatique tend à diminuer.

L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE, Water Use Efficiency) montre une relation entre la productivité des plantes et l'utilisation de l'eau, et est définie comme "la quantité de carbone assimilée sous forme de biomasse ou de produit céréalier par unité d'eau utilisée par la culture" (Hatfield and Dold 2019). Dans le contexte des changements climatiques, l'augmentation des températures et les modifications du régime des précipitations sont les deuxième et troisième facteurs ayant une influence sur la WUE, le premier étant l'augmentation de la concentration de CO_2 (Hatfield and Dold 2019). Plusieurs études ont montré une augmentation de la WUE en réponse à l'augmentation des températures et au stress hydrique, un WUE élevé étant une stratégie pour faire face aux conditions stressantes (Tambussi *et al.* 2007; Fahad *et al.* 2017; Lambrecht *et al.* 2017; Lamaoui *et al.* 2018).

Comment mesurer le WUE_i ?
Nous pouvons calculer le WUE instantané et intrinsèque grâce à des mesures d'échanges gazeux foliaires qui sont détaillées p.38.
WUE instantanée (μmol CO_2 mmol H_2O^{-1}) = A_i/E_i
WUE intrinsèque (μmol CO_2 mol H_2O^{-1}) = A_i/g_s
A_i : taux instantané de photosynthèse
E_i : taux instantané de transpiration
g_s : conductance stomatique

Le stress hydrique et l'augmentation des températures affectent également la capture des nutriments par les plantes, qui sont absorbés par les racines. L'augmentation des températures tend à réduire la croissance des racines, ce qui limite l'apport en nutriments et en eau pour les plantes. Le stress hydrique, en affectant le flux de transpiration, limite le mouvement des nutriments et leur capture par les racines. L'équilibre entre les nutriments est également affecté, ce qui a des conséquences sur la croissance des plantes. En général, sous stress hydrique, l'absorption de N augmente, l'absorption de P diminue et l'absorption de K tend à rester stable (Fahad *et al.* 2017).

4.3.2. Photosynthèse

Dans le processus de photosynthèse, deux événements clés se produisent : les réactions dépendantes de la lumière ou phase claire (phase photochimique), menant à la production

d'ATP et de NADPH, et les réactions indépendantes de la lumière ou phase sombre, dans lesquelles le CO_2 est intégré au cycle de Calvin afin de produire des hydrates de carbone (avec consommation d'ATP et de NADPH, Fig. 13). Plusieurs composants sont inclus dans le processus : les pigments photosynthétiques, les photosystèmes, le système de transport des électrons et les voies de réduction du CO_2. L'augmentation des températures et le stress hydrique peuvent avoir un effet négatif sur l'un ou l'autre des composants du processus, entraînant une réduction globale des performances photosynthétiques (Suzuki *et al.* 2014; Lamaoui *et al.* 2018).

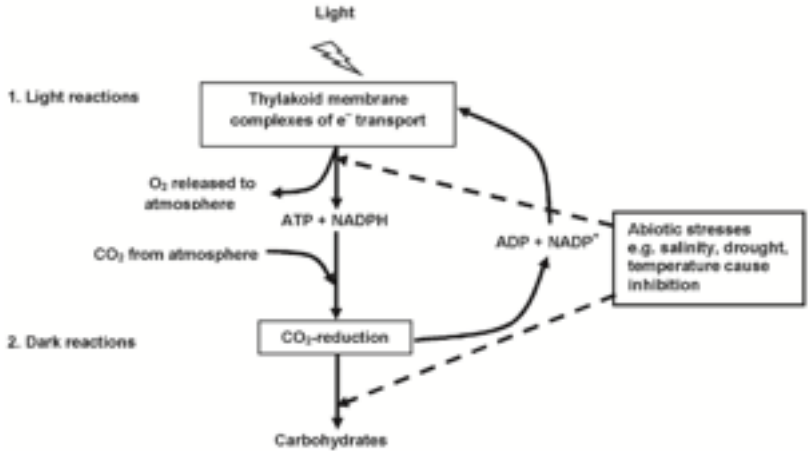


Figure 13 : Phases claire (photochimique) et sombre (cycle de Calvin) de la photosynthèse en lien avec l'action des stress abiotiques (Ashraf and Harris 2013)

La teneur en chlorophylle est corrélée à l'activité de la photosynthèse (Poorter *et al.* 2013; Croft *et al.* 2017). La chlorophylle est sensible aux stress abiotiques. Lorsque l'augmentation des températures provoque un stress thermique, cela conduit à une réduction de la biosynthèse de la chlorophylle, résultant probablement de la dégradation des enzymes qui sont impliquées dans sa biosynthèse (Ashraf and Harris 2013; Fahad *et al.* 2017). Le stress hydrique peut également accélérer la dégradation de la chlorophylle et une diminution de la teneur en chlorophylle est couramment observée. Ces conditions de stress sont particulièrement délétères pour les membranes thylakoïdes (Muhammad *et al.* 2021). Le rapport entre les chlorophylles a et b peut augmenter dans des conditions de sécheresse (Ashraf and Harris 2013; Fahad *et al.* 2017).

Comment mesurer la teneur en chlorophylle ?

Plusieurs techniques de mesure existent et sont soit destructives, soit non destructives. Pour mesurer précisément la teneur en chlorophylle des feuilles, on peut prélever un échantillon de feuille et mesurer la concentration en chlorophylle à l'aide d'un spectromètre après préparation de l'échantillon. Pour une mesure plus pratique et non destructive, nous pouvons utiliser un chlorophylomètre pour mesurer une valeur relative de l'indice de teneur en chlorophylle (CCI) basée sur l'absorbance spectrale de la lumière. Le CCI est uniquement utilisé pour comparer les valeurs entre elles.

La photosynthèse est principalement limitée dans des conditions de stress en raison de la diminution de la conductance stomatique, ce qui réduit la disponibilité du CO_2 pour le processus de photosynthèse (Ashraf and Harris 2013; Muhammad *et al.* 2021). En plus de cet effet, le stress hydrique et l'augmentation des températures ont d'autres effets négatifs. L'augmentation des températures, et le stress hydrique dans une moindre mesure, ont un effet négatif sur les réactions dépendantes de la lumière, en altérant l'activité du photosystème II (PSII) (Prasad *et al.* 2008; Sainz *et al.* 2010; Ashraf and Harris 2013; Fahad *et al.* 2017). Le photosystème est le premier complexe protéique intervenant dans les réactions dépendantes de la lumière, où les enzymes capturent les photons de la lumière pour énergiser l'électron. La réduction de l'efficacité des photosystèmes induit une réduction de la capacité photosynthétique. Cependant, des études ont rapporté que le stress hydrique a également un impact négatif sur les membranes thylakoïdes et le PSII (Muhammad *et al.* 2021). Ces impacts entraînent une faible production d'ATP et de NADPH, les deux principaux produits des réactions dépendantes de la lumière, qui sont essentiels pour le cycle de Calvin, dans les réactions indépendantes de la lumière (Ashraf and Harris 2013).

Comment mesurer l'efficacité d'absorption de la lumière des photosystèmes ?

L'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle est en partie utilisée pour la photosynthèse (photochimie) et l'autre partie est dissipée sous forme de chaleur ou réémise sous forme de lumière, la fluorescence chlorophyllienne. Ces trois processus sont en concurrence, c'est-à-dire que si l'un d'eux augmente, les deux autres peuvent diminuer. En mesurant l'émission de la fluorescence chlorophyllienne, nous pouvons obtenir des informations sur l'efficacité de la photochimie. Bien que l'émission de la fluorescence de la chlorophylle ne représente pas plus de 1 à 2 % de la lumière totale absorbée par la chlorophylle, sa mesure est assez facile et non invasive. Lorsque le photosystème absorbe de la lumière, une plastoquinone (QA) est réduite et ne peut absorber un autre électron, jusqu'à ce qu'elle ait transmis le premier électron à un second porteur d'électrons (QB). Pendant cette période, le centre réactionnel du photosystème est qualifié de "fermé", la lumière ne peut pas être absorbée et est dissipée ou réémise. En allumant et éteignant la lumière de manière appropriée, plusieurs paramètres concernant l'efficacité de la photochimie peuvent être calculés (Maxwell and Johnson 2000).

φPSII : rendement quantique de PSII

Ce paramètre mesure la proportion de la lumière absorbée par la chlorophylle associée à la PSII qui est utilisée pour la photochimie. Il peut donner une mesure du taux de transport linéaire des électrons. La relation entre ce paramètre et l'efficacité de la fixation du carbone est forte et linéaire.

qP : quenching photochimique

Ce paramètre donne une indication de la proportion des centres de réaction du PSII qui sont ouverts.

Fv/Fm : rendement quantique maximal du PSII.
Ce paramètre est la combinaison des 2 précédents, Fv/Fm = φPSII/qP. Il correspond au rendement maximal de PSII (par exemple, le rendement quantique si tous les centres PSII étaient ouverts) et fournit une indication de la capacité photosynthétique globale (Ashraf and Harris 2013). Les valeurs optimales se situent autour de 0,83 pour la plupart des espèces végétales, des valeurs inférieures peuvent indiquer que les plantes sont exposées à des conditions stressantes (Muhammad *et al.* 2021).

NPQ : quenching non-photochimique
Ce paramètre est linéairement lié à la dissipation de chaleur. On peut s'attendre à des valeurs comprises entre 0,5 et 3,5.

Le stress hydrique affecte principalement la phase de la photosynthèse indépendante de la lumière., en altérant l'activité de la Rubisco, une enzyme importante impliquée dans la première étape majeure de la fixation du carbone (Fahad *et al.* 2017).

Comment mesurer le taux net de photosynthèse ?
Ce paramètre peut être obtenu grâce à des mesures d'échanges gazeux. Ces mesures sont instantanées et non destructives. La feuille est enfermée dans une chambre transparente. Le taux de CO_2 fixé par la feuille enfermée est déterminé en mesurant la variation de la concentration en CO_2 de l'air qui traverse la chambre. La mesure précise est effectuée par un détecteur infrarouge. Les molécules de CO_2 absorbent le rayonnement à des bandes d'ondes infrarouges (IR) spécifiques. Le dispositif "analyseur de gaz infrarouge" (IRGA) mesure la réduction de la transmission des bandes d'ondes IR causée par la présence de CO_2 entre la source de rayonnement et le détecteur. Ce système nous permet d'obtenir principalement, le taux de photosynthèse (A_i, μmol $CO_2.m^{-2}.s^{-1}$), le taux de transpiration (E_i, mmol $H_2O.m^{-2}.s^{-1}$) et la conductance stomatique (g_s, mol $H_2O.m^{-2}.s^{-1}$).

Enfin, l'augmentation des températures, ainsi que le stress hydrique, peuvent affecter la répartition des assimilats entre les organes sources et puits et le rapport entre croissances aérienne et racinaire (Lemoine *et al.* 2013; Gray and Brady 2016). Les organes sources (les feuilles) produisent via la photosynthèse des carbohydrates, qui sont ensuite exportés vers des organes puits (les racines ou les fleurs par exemple) ; jusqu'à 80% des carbohydrates produits via la photosynthèse dans les feuilles matures sont exportés ailleurs dans la plante via le phloème (Lemoine *et al.* 2013). L'organe puit a une capacité concurrentielle par rapport à d'autres organes à attirer et à stocker des assimilats (Marcelis 1996). En conditions de stress abiotique, la répartition des assimilats peut être modifiée entre les organes végétatifs et les organes reproducteurs, ces derniers étant reconnus comme des organes puits (Ji *et al.* 2010).

4.3.3. Dommages oxydatifs

Tous les stress abiotiques, y compris le stress hydrique et l'augmentation des températures, peuvent conduire à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS,

reactive oxygen species, Wahid *et al.* 2007; Pandey *et al.* 2015; Fahad *et al.* 2017). Les ROS constituent une menace sérieuse pour le fonctionnement des cellules en endommageant les lipides et les protéines. Afin de faire face aux dommages oxydatifs, les plantes comptent sur la défense antioxydante qui peut être un composant enzymatique ou non enzymatique comme les caroténoïdes (Fahad *et al.* 2017). Cependant, la machinerie antioxydante peut également être altérée par les stress abiotiques eux-mêmes (Zandalinas *et al.* 2018).

4.4. Conséquences sur la floraison et la phase reproductive

Tous les stades de la phase reproductive, depuis l'initiation des fleurs jusqu'à la formation de fruits et de graines, ainsi que tous les organes reproducteurs peuvent être affectés négativement par la combinaison d'une hausse de température et d'un stress hydrique. La phase reproductive est particulièrement sensible aux stress abiotiques, en comparaison avec la phase végétative (Snider and Oosterhuis 2011; Hedhly 2011; Suzuki *et al.* 2014; Hatfield and Prueger 2015; Scheepens *et al.* 2018; Amuji *et al.* 2020). Les stress hydrique et thermique sont particulièrement délétères lorsqu'ils surviennent au début de la phase de reproduction et pendant la période de floraison (Barnabás *et al.* 2008 ; Scheepens *et al.* 2018). Même si les stress influencent tous les deux la phase reproductive, ils n'affectent pas nécessairement de la même manière les organes reproducteurs (Barnabás *et al.* 2008). Les organes reproducteurs mâles sont plus sensibles au stress thermique que les organes reproducteurs femelles (Hedhly 2011; Suzuki *et al.* 2014). Toutefois, la combinaison des deux stress est aussi délétère pour les organes floraux, causant plus de dégâts que lorsque les stress sont appliqués individuellement (Suzuki *et al.* 2014).

À ce jour, la plupart des études portant sur les effets de la température et du stress hydrique sur les interactions plantes-pollinisateurs se concentrent sur la phénologie et la distribution des plantes et des insectes (Hegland *et al.* 2009; Bartomeus *et al.* 2011; González-Varo *et al.* 2013; Settele *et al.* 2016), comme décrit à la section 3.2. Peu d'études considèrent les effets de ces contraintes abiotiques sur les interactions plantes-pollinisateurs via les modifications des signaux floraux et ressources florales des plantes, alors que ceux-ci sont au cœur de la relation entre les plantes et les pollinisateurs (Scaven and Rafferty 2013; Parmesan and Hanley 2015; Forrest 2016).

Le chapitre 1 détaille les effets de la sécheresse sur le développement reproducteur des plantes entomophiles, ainsi que les conséquences de la modification des signaux floraux et des récompenses florales. Les principales informations sont néanmoins décrites dans les paragraphes suivants.

4.4.1. Durée de floraison et nombre de fleurs

Lorsque les stress interviennent avant la floraison, ils peuvent entrainer une transition florale plus rapide. Une transition florale accélérée peut réduire la capacité des plantes à accumuler suffisamment de ressources pour le bon développement des organes

reproducteurs (Zinn *et al.* 2010). Si les stress interviennent pendant la floraison, ils réduisent la durée totale de floraison ainsi que la période de maturation des graines (Taiz *et al.* 2015; Fahad *et al.* 2017). Le stress hydrique peut ralentir, voire stopper, le développement des structures reproductrices (Su *et al.* 2013). Ces contraintes abiotiques peuvent provoquer l'avortement des boutons floraux et réduire le nombre de fleurs, entraînant une diminution du succès reproducteur (Morrison and Stewart 2002; Muhl *et al.* 2014; Fahad *et al.* 2017). Le nombre et la taille des fleurs diminuent en cas de stress hydrique et thermique (Carroll *et al.* 2001; Glenny *et al.* 2018; Phillips *et al.* 2018; Takkis *et al.* 2018). Ils peuvent également affecter la taille des organes floraux (sépales, pétales, filament des anthères ; Carroll *et al.* 2001; Koti *et al.* 2005; Sato *et al.* 2006).

4.4.2. Pollen, gamétophyte mâle

La majorité des grains de pollen matures sont résistants aussi bien aux hautes ou basses températures qu'à la dessiccation, cependant cette capacité de résistance est perdue lorsque des stress ont lieu durant la période de développement et de maturation du pollen (Franchi *et al.* 1996). Tous les stades du développement du pollen sont particulièrement sensibles aux stress abiotiques (Koti *et al.* 2005; Mesihovic *et al.* 2016; Pacini and Dolferus 2019). Le développement du pollen est très coûteux pour la plante, car les grains doivent être remplis par des carbohydrates, synthétisés par les tissus photosynthétiques ; ces carbohydrates sont ensuite convertis et stockés sous forme d'amidon ou de lipides (Jin *et al.* 2013; Borghi *et al.* 2019). Ces différents mécanismes de transport et d'allocation des carbohydrates sont particulièrement sensibles aux stress et, lorsqu'ils surviennent, cela provoque un arrêt de développement des grains de pollen et des conséquences irréversibles sur la fertilité (Borghi *et al.* 2019). Les différents effets observés résultant d'une hausse de température combinée à un stress hydrique sont une production moindre de pollen (diminution du nombre de grains de pollen matures, Devasirvatham *et al.* 2016, Waser and Price 2016), un développement anormal du pollen (Koti *et al.* 2005), entraînant une diminution de la viabilité pollinique et de sa capacité de germination (Fang *et al.* 2010; Su *et al.* 2013; Paupière *et al.* 2017) et un développement anormal des anthères, pouvant réduire la capacité de dispersion du pollen et donc son transfert (Smith and Zhao 2016). La croissance du tube pollinique peut également être réduite ce qui entraine une diminution de la fécondation (Fang *et al.* 2010).

4.4.3. Carpelle, gamétophyte femelle

Bien que les carpelles semblent généralement moins sensibles au stress abiotiques que les étamines (Su *et al.* 2013; Devasirvatham *et al.* 2016; Teixido and Valladares 2019), les stress hydrique et thermique peuvent avoir un impact négatif sur la réceptivité des stigmates ou le nombre d'ovules (Turner 1993; Frazee and Marquis 1994; Hedhly 2011; Kay and Picklum 2013). L'apport insuffisant de carbohydrates au niveau du réceptacle de la fleur, ainsi qu'une modification de la répartition des photoassimilats au niveau du carpelle semble être la première cause d'infertilité des organes reproducteurs femelles lors de stress abiotiques (Borghi *et al.* 2019). Certaines études ont rapporté l'avortement des

ovaires sous stress de sécheresse (Alqudah *et al.* 2011; Smith and Zhao 2016). Des avortement post-fécondation sont aussi observés, ce qui entrave la formation des graines (Sehgal *et al.* 2019). Ces deux stress appliqués pendant le développement reproducteur conduisent à une réduction de la production de fruits et de graines (Hedhly 2011; Pandey *et al.* 2015).

4.4.4. Couleur et odeur des fleurs

La couleur des fleurs semble être préservée lors de stress hydrique ou thermique, la couleur des fleurs étant un signal important pour les pollinisateurs (Borghi *et al.* 2019). Toutefois, il semblerait qu'une augmentation de température ainsi que le déficit hydrique influencent l'accumulation d'anthocyanine, ce qui peut contribuer à éclaircir les fleurs ou les assombrir (Lai *et al.* 2011; Zhao and Tao 2015). En plus de la pigmentation, d'autres paramètres interviennent dans la couleur des fleurs, comme son aspect réfléchissant ou son contraste (van der Kooi *et al.* 2019); une étude récente sur *Aquilegia vulgaris* a montré une augmentation de la réflectivité de la fleur en réponse à la sécheresse(Brunet and Van Etten 2019). Cependant, l'influence des stress abiotiques sur ces paramètres sont pratiquement inconnus à ce jour.

Les plantes entomophiles utilisent aussi des signaux olfactifs pour attirer les pollinisateurs. L'émission de ces molécules dépend de leur biosynthèse qui peut être limitée par les stress abiotiques (Borghi *et al.* 2019). De plus, les VOC ont des propriétés de volatilité, de solubilité et de diffusion qui sont spécifiques à chaque composé. Les études montrent une influence des stress abiotiques sur la composition du bouquet floral (Farré-Armengol *et al.* 2013; Farré-Armengol *et al.* 2014; Burkle and Runyon 2017; Campbell *et al.* 2019).

4.4.5. Production de nectar

Les températures élevées et le stress hydrique affectent la production de nectar en modifiant le volume du nectar et sa concentration en sucres. Le volume du nectar augmente généralement avec la température, jusqu'à une température optimale propre à chaque espèce (Nicolson and Susan 2007). Au-delà de cette température optimale, le volume du nectar diminue (Takkis *et al.* 2015, 2018; Mu *et al.* 2015). Cependant, lorsque la température augmente graduellement, certaines espèces montrent une acclimatation à ces températures et parviennent à maintenir leur production de nectar (Takkis *et al.* 2018). En réponse au stress hydrique, le volume du nectar diminue généralement (Carroll *et al.* 2001; Phillips *et al.* 2018; mais voir Suni *et al.* 2020). L'augmentation de la température et le stress hydrique semblent avoir moins d'effet sur la concentration en sucres (Carroll *et al.* 2001; Mu *et al.* 2015). Une moindre disponibilité des carbohydrates produits par la photosynthèse limite aussi la sécrétion de nectar (Borghi *et al.* 2019; Saddhe *et al.* 2021).

4.4.6. Pollinisation et succès reproducteur

Les changements induits par les stress abiotiques au niveau des organes floraux peuvent avoir des conséquences sur la reproduction des plantes.

Le taux de visite et l'efficacité des pollinisateurs peuvent être diminués. La modification des signaux floraux, comme par exemple le nombre de fleurs et leur taille, ainsi que les récompenses florales (nectar et pollen) ont des répercussions sur le comportement de visite des pollinisateurs ainsi que sur le type de pollinisateurs qui visitent les fleurs (Borrell 2005; Nicolson 2011; Fowler *et al.* 2016; Klumpers *et al.* 2019). Comme la taille de la corolle peut être réduite par des stress abiotiques, les pollinisateurs ayant des proboscis plus courts peuvent être favorisés. Les changements de pollinisateurs peuvent à leur tour affecter l'efficacité de la pollinisation, puisque par exemple les pollinisateurs plus petits ont un taux de dépôt de pollen en une seule visite inférieur à celui des pollinisateurs plus grands (Solís-Montero and Vallejo-Marín 2017). Par ailleurs, le taux de visite pourrait être affecté par une variation de la taille des fleurs (Gómez *et al.* 2008) ou par une modification de la composition du nectar ou du pollen (Kudo and Harder 2005; Wallisdevries *et al.* 2012; Somme *et al.* 2014; Höfer *et al.* 2021). Plusieurs études récentes ayant testé l'impact de signaux modifiés sur le comportement des pollinisateurs ont montré des résultats variables pour les taux de visite des pollinisateurs. Par exemple, les pollinisateurs visitent moins souvent les fleurs des plantes en stress hydrique par rapport à celles des plantes bien arrosées, en raison de la diminution significative des signaux visuels floraux, tels que le nombre et la taille des fleurs et la longueur du tube de la corolle (Höfer *et al.* 2021; Kuppler *et al.* 2021). Dans une autre étude, aussi sur l'influence du stress hydrique, les auteurs n'ont pas observé d'effets sur le taux de visite des fleurs pour 3 des 4 espèces végétales étudiées malgré des signaux floraux modifiés (Glenny *et al.* 2018).

Etant donné que les stress abiotiques peuvent influencer la taille des organes floraux, et que la distance entre les anthères et le stigmate peut diminuer, cela impacte le régime de reproduction, en favorisant l'auto-pollinisation par rapport à la pollinisation croisée. (Alvarado 2018). D'autres études mettent en avant la diminution de la pollinisation croisée en faveur de l'auto-pollinisation dans un contexte de changements climatiques globaux (Elle and Hare 2002; Eckert *et al.* 2010; Opedal *et al.* 2016)

5. Effets des sécheresses et hausses de température sur les insectes pollinisateurs

5.1. Effets sur leur physiologie et leur reproduction

La plupart des insectes étant ectothermes, la température influence directement leur métabolisme et les processus physiologiques, leur tolérance de température et leur préférence sont spécifiques à chaque espèce (Kingsolver and Huey 2008; Pincebourde *et*

al. 2016). La réponse thermique des insectes suit une courbe de performance, où sont définies : une température minimum au-dessus de laquelle la performance de l'insecte augmente, jusqu'à une certaine température optimale, au-dessus de laquelle la performance de l'insecte diminue, jusqu'à une température maximum de survie. Dès lors, le réchauffement climatique, va en général améliorer les performances des insectes, pour autant qu'on ne dépasse pas la température optimale et qu'on n'atteint pas la température maximum de survie (Pincebourde *et al.* 2016). Parmi les pollinisateurs, les bourdons ont un fonctionnement endothermique et des capacités de régulation de la chaleur. Récemment, le temps de résistance à des hautes températures[5] (40°C) a été mesuré pour plusieurs espèces. Ce temps de résistance varie entre espèces et est influencé par les zones biogéographiques d'origine. Ainsi, ce temps de résistance au choc thermique est de 20 minutes pour *B. polaris* (région boréale) à plus de 10h pour *B. terrestris* (aire de répartition assez large, Fig. 14). Plus l'aire de répartition est située à des hautes altitudes ou latitudes, moins l'espèce est résistante à la chaleur (choc thermique). Cette capacité à résister à la chaleur est un facteur qui explique les modifications d'aires de répartition des espèces car les plus résistantes ont tendance à accroitre leur aire distribution contrairement aux espèces plus sensibles à la chaleur.

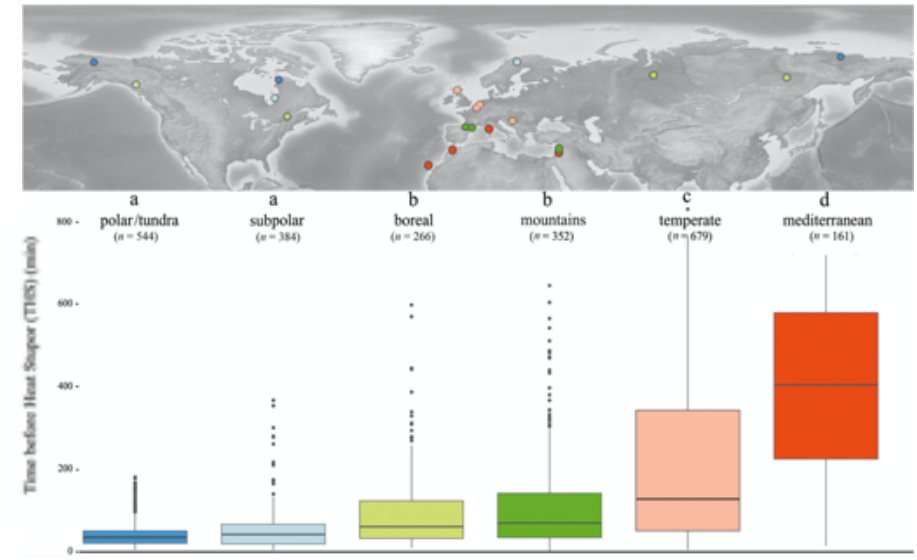


Figure 14: Variation dans la résistance à la chaleur (choc thermique) pour des différents individus de bourdons, regroupés suivant leur biotope : arctique ou tundra (bleu foncé), sub-arctique (bleu clair), boréal (vert clair), montagnard (vert foncé), tempéré (rouge clair), méditerranéen (rouge foncé). Les lettres a,b,c,d distinguent les groupes significativement différents à $p<0.05$ (test Kruskall Wallis). Extrait de Martinet *et al.* (2020).

La taille des bourdons est sensible à la température ; l'augmentation des températures moyennes tend à diminuer la taille du corps, probablement en raison d'un taux

[5] Cela correspond au temps avant que l'insecte ne perde ses fonctions neuromusculaires, ce qui le rend incapable de remplir ses fonctions biologiques (« *Time before heat stupor* »)

métabolique plus élevé et d'un développement accéléré (Kingsolver and Huey 2008). Une étude sur des colonies de *Bombus terrestris* a montré qu'une hausse de température entraine des impacts négatifs sur les colonies de bourdons, la croissance de la colonie est plus faible, ce qui la rend plus vulnérable (Vanderplanck *et al.* 2019). Alors que les adultes peuvent tolérer une large gamme de températures, ces derniers doivent réguler la température du nid pour maintenir une température propice au développement des larves (28-32°C). Cette capacité de régulation est réduite lorsque les adultes sont exposés à des températures plus importantes. Par ailleurs, plus d'ouvrières sont mobilisées pour réguler la température, ce qui réduit potentiellement la quantité de ressources collectées à l'extérieur du nid. Enfin, les capacités de reproduction sont réduites au-delà de 40°C, en particulier pour les espèces adaptées à des climats froids (Martinet *et al.* 2021).

Les conséquences directes des sécheresses sur les insectes, plus spécifiquement les abeilles, restent largement sous-étudiées (Woodard 2017). La régulation de l'apport en eau se fait à l'échelle de la colonie pour les insectes sociaux et à l'échelle individuelle pour les insectes solitaires (Nicolson 2009). Des différences de régulation existent aussi entre insectes sociaux, entre autres, entre *Apis mellifera* et *Bombus* spp. Les abeilles domestiques collectent directement de l'eau dans des points d'eau, ce que ne font pas les bourdons qui remplissent leurs besoins en eau via le nectar principalement (bien que certaines collectes directes aient aussi été observées, voir Ferry and Corbet, 1996 ; Woodard 2017).

5.2. Effets sur leur nutrition

Les sécheresses et les hausses de température vont influencer directement les productions de nectar et de pollen des fleurs, ce qui entraine aussi des modifications dans le comportement de visites des abeilles.

La composition et la qualité nutritionnelle des ressources florales jouent un rôle non négligeable dans la réponse des insectes par rapport à des phénomènes de sécheresses ou hausses de température. Il a été montré qu' une colonie de bourdons nourrie avec des ressources de qualité élevée subissait moins les effets d'une hausse de température (Vanderplanck *et al.* 2019). Or, aussi bien les sécheresses que les hausses de température modifient la sécrétion de nectar (volume, composition), tout comme potentiellement la composition du pollen (teneur en polypeptides, profil en acides aminés, stérols,..). De nombreuses études se concentrent sur les modifications de composition du pollen en réponse à des stress abiotiques du point de vue du succès reproducteur de la plante (viabilité pollinique), mais très peu s'intéressent à son contenu nutritionnel en tant que ressource alimentaire pour les insectes (Rering *et al.* 2020). Pour ces derniers, une diminution de la qualité du régime alimentaire entraine des effets à court terme en réduisant les activités des adultes et leur immunité, en diminuant la survie des adultes, et à long terme, en réduisant les populations d'insectes pollinisateurs (Kudo and Harder 2005; Naug 2009; Alaux *et al.* 2010; Pasquale *et al.* 2013, 2016; Ceulemans *et al.* 2017). L'effet d'une modification de composition peut être différent suivant les stratégies de nutrition, qui différent, par exemple, entre les abeilles domestiques qui nourrissent leurs

larves via de la gelée royale (la composition des ressources est modifiée par la glande hypopharyngiale) et les abeilles solitaires dont les larves consomment le pollen directement stocké au niveau du nid (Vaudo *et al.* 2020).

Il a été montré par ailleurs qu'un manque de ressources se répercute directement sur les populations de pollinisateurs (Naug 2009; Goulson *et al.* 2015; Miller-Struttmann *et al.* 2015; Baude *et al.* 2016). Ce manque est particulièrement dommageable pour les espèces qui font peu de stock de nourriture. Ainsi à la différence des abeilles domestiques, les colonies de bourdons ont un stock de quelques jours de pollen et de nectar ce qui les rend plus vulnérables à un déficit de ressources florales (Rotheray *et al.* 2017). Cette pénurie de ressources est d'autant plus dommageable pour certaines abeilles solitaires et oligolectiques, qui peuvent avoir une période de vol plus réduite que les espèces sociales. En réponse à une hausse de température et un stress hydrique, les quantités de ressources florales sont impactées et diminuent pour plusieurs espèces. Par ailleurs, ces stress abiotiques qui interviennent durant la période estivale tendent à raccourcir les durées de floraison (Cleland *et al.* 2012; Høye *et al.* 2013), ce qui accentue le creux de ressources florales à la fin de l'été (Balfour *et al.* 2018; Abrahamczyk *et al.* 2020; Simanonok *et al.* 2020).

Récemment, les études se concentrant sur l'impact des changements climatiques sur les populations de pollinisateurs mettent en avant l'importance des effets indirects via la modification des ressources florales disponibles par rapport aux effets directs des variables climatiques sur les pollinisateurs. Ainsi, une étude menée sur 8 ans a montré que l'abondance des abeilles a été principalement déterminée par les effets indirects du climat sur la distribution temporelle des ressources florales (Ogilvie *et al.* 2017).

Ces effets directs combinés à des effets indirects sur la quantité et la qualité des ressources florales collectées rendent les interactions plantes-pollinisateurs particulièrement vulnérables dans un contexte de changements climatiques (Vanderplanck *et al.* 2019).

6. Questions de recherche et organisation de la thèse

Cette thèse a pour objectif d'étudier les modifications morphologiques, physiologiques et reproductives induites par le stress hydrique et l'augmentation de la température ainsi que les répercussions potentielles pour les interactions plantes-pollinisateurs.

Pour parvenir à cet objectif, nous avons choisi quatre espèces modèles entomophiles : *Borago officinalis*, *Echium plantagineum* et *E. vulgare*, *Impatiens glandulifera*. Le choix de ces espèces a été effectué sur base des critères suivants :

- espèces hautement attractives pour les pollinisateurs, en particulier les abeilles, de préférence à floraison estivale lors du besoin maximum en ressources des colonies ;

- annuelles/bisannuelles et à croissance rapide, de culture facile déjà établie, et d'une taille modeste pour permettre des cultures en pots, à floraison étalée et abondante ;
- production à la fois de nectar et de pollen en quantités non négligeables (> 1µl de nectar/fleur) ;
- fleurs de taille suffisante pour permettre des prélèvements et des mesures aisées.

Les trois questions de recherche sont décrites ci-dessous, ainsi que les principales analyses effectuées pour y répondre.

(i) Quelles sont les réponses des plantes en termes de morphologie, physiologie et traits floraux lorsqu'elles sont soumises à un stress hydrique, une hausse de température et à leur combinaison durant leur période de floraison ?

Nous avons analysé les réponses des quatre espèces modèles en suivant le même protocole expérimental en conditions contrôlées. Six traitements ont été appliqués, résultant de la combinaison de trois températures (21, 24 et 27°C) et de deux régimes hydriques (déficit d'arrosage *versus* arrosage régulier). Pour comprendre les réponses coordonnées à l'échelle de la plante entière, nous avons mesuré un ensemble de traits liés à la morphologie (nombre de feuilles, hauteur des plantes,...), à la physiologie (teneur en chlorophylle, efficacité de la photosynthèse,…) et de traits floraux (nombre de fleurs, taille des fleurs,…).

(ii) Les quantités et compositions des récompenses florales (pollen et nectar) sont-elles modifiées par un stress hydrique combiné à une hausse de température ?

Nous avons analysé la quantité de nectar produite (volume et concentration) suivant les 6 traitements pour les quatre espèces modèles ainsi que la viabilité du pollen. Nous avons quantifié précisément les modifications dues à ces stress en termes de composition des ressources florales pour *B. officinalis* : pour le nectar, les teneurs et la composition en sucres et en acides aminés ; pour le pollen, la teneur en polypeptides et la composition en acides aminés. Nous avons aussi mesurer la teneur en polypeptides du pollen pour *I. glandulifera.*

(iii) Comment le comportement de visite des pollinisateurs est-il affecté en conséquence?

Nous avons effectué des observations de pollinisateurs *in natura* et en conditions contrôlées. Tout d'abord, *in natura*, nous avons suivi des insectes sur des plantes après leur exposition aux 6 traitements durant 5 semaines. Ensuite, nous avons observé des bourdons naïfs sur des plantes exposées à deux températures (21°C *versus* 26°C) pour mesurer précisément la modification éventuelle de leur comportement de visite.

La thèse est constituée de 4 parties. La partie I reprend l'introduction générale ainsi que le chapitre 1.

- Le chapitre 1 consiste en une revue de la littérature sur l'impact de la sécheresse sur les interactions plantes-pollinisateurs. Ce chapitre complète l'introduction générale et constitue la partie I de la thèse.

Les 5 chapitres suivants décrivent l'ensemble des expériences menées dans le cadre de cette thèse pour répondre aux trois questions de recherche (Fig. 15).



Figure 15: Organisation des chapitres 2 à 6 de la thèse en fonction des thèmes explorés et des espèces modèles. Les chapitres 2 à 4 se concentrent surtout la 1ère question de recherche concernant les impacts sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux, bien qu'ils abordent aussi la 2ème et la 3ème ; le chapitre 5 approfondit la 2ème question de recherche sur les ressources florales et le chapitre 6, la 3ème question de recherche lié au comportement des pollinisateurs.

La partie II reprend les chapitres 2 à 4 qui explorent chacun les réponses des espèces modèles pour documenter essentiellement la première question de recherche sur les modifications de morphologie, physiologie et traits floraux consécutives à une exposition à des stress combinés de hausse de température et déficit hydrique.

- Le chapitre 2 décrit la réponse de *Borago officinalis*. Cette étude était la première à explorer la réponse d'une espèce entomophile à une augmentation de température combinée à un stress hydrique ; nous avons analysé la morphologie, la physiologie ainsi que les modifications des signaux floraux. Nous avons conclu cette première étude en exposant les plantes aux pollinisateurs *in natura*.
- Le chapitre 3 concernait deux autres espèces de Boraginaceae appartenant au même genre, *Echium plantagineum* et *E. vulgare*. Ces espèces sont proches en

termes de morphologie mais diffèrent par leur cycle de vie (*E. plantagineum* est une espèce annuelle et *E. vulgare* une espèce bisannuelle). A travers ce chapitre, nous avons voulu comprendre si ces deux espèces avaient des réponses similaires lorsqu'elles étaient placées sous l'effet d'une augmentation de température combinée à un stress hydrique. Nous avons également suivi le développement végétatif et reproducteur.

- Le chapitre 4 a permis d'approfondir les liens entre les modifications physiologiques dues à la combinaison des stress et les réponses des signaux floraux (traits floraux et récompenses) sur *I. glandulifera.*

La partie III de la thèse reprend les chapitres 5 et 6 qui sont des approfondissements des 2ème et 3ème questions de recherche, concernant, respectivement, les modifications de ressources florales (quantité, composition) et les modifications de comportement des pollinisateurs. Ces deux chapitres ont été réalisés en travaillant avec *B. officinalis* comme espèce modèle.

- Le chapitre 5 est consacré plus particulièrement à la deuxième question de recherche concernant la modification en termes de composition des récompenses florales de *B. officinalis* due à l'augmentation de température combinée au stress hydrique. Des analyses de la composition en sucres et en acides aminés du nectar ainsi que de la teneur en polypeptides et composition en acides aminés du pollen ont été menées.
- Le chapitre 6 a permis d'approfondir la troisième question de recherche concernant le comportement des pollinisateurs ; dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au comportement de bourdons naïfs (*Bombus terrestris*) par rapport à des plantes de *B. officinalis* cultivées à deux températures différentes (21 et 26°C) et montrant des différences au niveau des signaux floraux et des récompenses florales.

Enfin, la thèse se termine par une partie IV reprenant une discussion générale, les limites de l'étude ainsi que des perspectives.

7. Références

Abrahamczyk S, Wohlgemuth T, Nobis M, Nyffeler R, Kessler M. **2020**. Shifts in food plant abundance for flower-visiting insects between 1900 and 2017 in the canton of Zurich, Switzerland. *Ecological Applications* **30**: e02138.

Aizen MA, Aguiar S, Biesmeijer JC, *et al.* 2019. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology* **25**: 3516–3527.

Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. **2010**. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*: rsbl20090986.

Alqudah AM, Samarah NH, Mullen RE. **2011**. drought stress effect on crop pollination, seed set, yield and quality In: Lichtfouse E, ed. Sustainable Agriculture Reviews. *Alternative Farming Systems, Biotechnology, Drought Stress and Ecological Fertilisation*. Springer Netherlands, 193–213.

Amuji CF, Beaumont LJ, Atwell BJ. **2020**. The effect of co-occurring heat and water stress on reproductive traits and yield of tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Horticulture Journal* **advpub**.

Ashraf M, Harris PJC. **2013**. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* **51**: 163–190.

Austin MW, Horack P, Dunlap AS. **2019**. Choice in a floral marketplace: the role of complexity in bumble bee decision-making. *Behavioral Ecology* **30**: 500–508.

Babu RC, Pathan MS, Blum A, Nguyen HT. **1999**. Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Science* **39**: cropsci1999.0011183X003900010024x.

Balfour NJ, Ollerton J, Castellanos MC, Ratnieks FLW. **2018**. British phenological records indicate high diversity and extinction rates among late-summer-flying pollinators. *Biological Conservation* **222**: 278–283.

Barnabás B, Jäger K, Fehér A. **2008**. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment* **31**: 11–38.

Barragán-Fonseca KY, Loon JJA van, Dicke M, Lucas-Barbosa D. **2020**. Use of visual and olfactory cues of flowers of two brassicaceous species by insect pollinators. *Ecological Entomology* **45**: 45–55.

Bartomeus I, Ascher JS, Wagner D, *et al.* 2011. Climate-associated phenological advances in bee pollinators and bee-pollinated plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 20645–20649.

Baude M, Kunin WE, Boatman ND, *et al.* 2016. Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature* **530**: 85.

Bauer AA, Clayton MK, Brunet J. **2017**. Floral traits influencing plant attractiveness to three bee species: Consequences for plant reproductive success. *American Journal of Botany* **104**: 772–781.

Bedford FE, Whittaker RJ, Kerr JT. **2012**. Systemic range shift lags among a pollinator species assemblage following rapid climate change. *Botany* **90**: 587–597.

Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W, Courchamp F. **2012**. Impacts of

climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters* **15**: 365–377.
Benadi G, Hovestadt T, Poethke H-J, Blüthgen N. **2014**. Specialization and phenological synchrony of plant–pollinator interactions along an altitudinal gradient. *Journal of Animal Ecology* **83**: 639–650.
Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, *et al.* 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**: 351–354.
Blüthgen N. **2010**. Why network analysis is often disconnected from community ecology: A critique and an ecologist's guide. *Basic and Applied Ecology* **11**: 185–195.
Bogusch P, Bláhová E, Horák J. **2020**. Pollen specialists are more endangered than non-specialised bees even though they collect pollen on flowers of non-endangered plants. *Arthropod-Plant Interactions* **14**: 759–769.
Borghi M, Perez de Souza L, Yoshida T, Fernie AR. **2019**. Flowers and climate change: a metabolic perspective. *New Phytologist* **224**: 1425–1441.
Borrell BJ. **2005**. Long tongues and loose niches: evolution of euglossine bees and their nectar flowers. *Biotropica* **37**: 664–669.
Bouzid M, He F, Schmitz G, *et al.* 2019. *Arabidopsis* species deploy distinct strategies to cope with drought stress. *Annals of Botany* **124**: 27–40.
Briscoe AD, Chittka L. **2001**. The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology* **46**: 471–510.
Brodschneider R, Crailsheim K. **2010**. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**: 278–294.
Brown MJF, Dicks LV, Paxton RJ, *et al.* 2016. A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination. *PeerJ* **4**: e2249.
Brunet J, Van Etten ML. **2019**. The response of floral traits associated with pollinator attraction to environmental changes expected under anthropogenic climate change in high-altitude habitats. *International Journal of Plant Sciences* **180**: 954–964.
Burger H, Dötterl S, Ayasse M. **2010**. Host-plant finding and recognition by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee. *Functional Ecology* **24**: 1234–1240.
Burkle LA, Runyon JB. **2017**. The smell of environmental change: Using floral scent to explain shifts in pollinator attraction. *Applications in Plant Sciences* **5**.
Campbell DR, Sosenski P, Raguso RA. **2019**. Phenotypic plasticity of floral volatiles in response to increasing drought stress. *Annals of Botany* **123**: 601–610.
Carroll AB, Pallardy SG, Galen C. **2001**. Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **88**: 438–446.
Carvell C, Bourke AFG, Dreier S, *et al.* 2017. Bumblebee family lineage survival is enhanced in high-quality landscapes. *Nature* **543**: 547–549.
Carvell C, Westrich P, Meek WR, Pywell RF, Nowakowski M. **2006**. Assessing the value of annual and perennial forage mixtures for bumblebees by direct observation and pollen analysis. *Apidologie* **37**: 326–340.
Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, García A, Pringle RM, Palmer TM. **2015**. Accelerated modern human–induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances* **1**: e1400253.
Ceulemans T, Hulsmans E, Ende WV, Honnay O. **2017**. Nutrient enrichment is

associated with altered nectar and pollen chemical composition in Succisa pratensis Moench and increased larval mortality of its pollinator *Bombus terrestris* L. *PLOS ONE* **12**: e0175160.

Chai Q, Gan Y, Zhao C, *et al.* 2016. Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **36**: 3.

Chittka L, Raine NE. 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 428–435.

Cleland EE, Allen JM, Crimmins TM, *et al.* 2012. Phenological tracking enables positive species responses to climate change. *Ecology* **93**: 1765–1771.

Cohen JM, Lajeunesse MJ, Rohr JR. 2018. A global synthesis of animal phenological responses to climate change. *Nature Climate Change* **8**: 224–228.

Conner JK, Hartl DL. 2004. *A primer of ecological genetics*. Sinauer Associates Incorporated.

Cook SM, Awmack CS, Murray DA, Williams IH. 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* **28**: 622–627.

Crausbay SD, Ramirez AR, Carter SL, *et al.* 2017. Defining ecological drought for the twenty-first century. *Bulletin of the American Meteorological Society* **98**: 2543–2550.

Croft H, Chen JM, Luo X, Bartlett P, Chen B, Staebler RM. 2017. Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology* **23**: 3513–3524.

Dai A. 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change* **3**: 52–58.

Dellinger AS. 2020. Pollination syndromes in the 21st century: where do we stand and where may we go? *New Phytologist* **228**: 1193–1213.

Devasirvatham V, Tan DKY, Trethowan RM. 2016. Breeding strategies for enhanced plant tolerance to heat stress In: *Advances in plant breeding strategies: agronomic, abiotic and biotic stress traits*. Springer, Cham, 447–469.

Duchenne F, Thébault E, Michez D, *et al.* 2020. Phenological shifts alter the seasonal structure of pollinator assemblages in Europe. *Nature Ecology & Evolution* **4**: 115–121.

Dunne JA, Williams RJ, Martinez ND. 2002. Food-web structure and network theory: The role of connectance and size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 12917–12922.

Dusenge ME, Duarte AG, Way DA. 2019. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO_2 and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytologist* **221**: 32–49.

Eckert CG, Kalisz S, Geber MA, *et al.* 2010. Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 35–43.

EEA (European Enronment Agency). 2017. *Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2016: An indicator-based report*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Elle E, Hare JD. 2002. Environmentally induced variation in floral traits affects the mating system in *Datura wrightii*. *Functional Ecology* **16**: 79–88.

Faegri K, Pijl LVD. 1979. *Principles of Pollination Ecology*. Elsevier.

Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, *et al.* 2017. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science* **8**.

Fang X, Turner NC, Yan G, Li F, Siddique KHM. **2010**. Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. *Journal of Experimental Botany* **61**: 335–345.

Farré-Armengol G, Filella I, Llusià J, Niinemets Ü, Peñuelas J. **2014**. Changes in floral bouquets from compound-specific responses to increasing temperatures. *Global Change Biology* **20**: 3660–3669.

Farré-Armengol G, Filella I, Llusia J, Peñuelas J. **2013**. Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **15**: 56–67.

Feehan J, Harley M, Minnen J. **2009**. Climate change in Europe. Impact on terrestrial ecosystems and biodiversity. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **29**: 409–421.

Feller U. **2016**. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. *Journal of Plant Physiology* **203**: 84–94.

Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD. **2004**. Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**: 375–403.

Ferry C, Corbet SA. **1996**. Water Collection by Bumble Bees. *Journal of Apicultural Research* **35**: 120–122.

Fisogni A, Massol F, de Manincor N, *et al.* 2021. Network analysis highlights increased generalisation and evenness of plant-pollinator interactions after conservation measures. *Acta Oecologica* **110**: 103689.

Forrest JRK. **2016**. Insect pollinators and climate change In: *Global Climate Change and Terrestrial Invertebrates*.71–91.

Fowler RE, Rotheray EL, Goulson D. **2016**. Floral abundance and resource quality influence pollinator choice. *Insect Conservation and Diversity* **9**: 481–494.

Franchi GG, Bellani L, Nepi M, Pacini E. **1996**. Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora* **191**: 143–159.

Franks SJ, Weber JJ, Aitken SN. **2014**. Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. *Evolutionary Applications* **7**: 123–139.

Frazee JE, Marquis RJ. **1994**. Environmental contribution to floral trait variation in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *American Journal of Botany* **81**: 206–215.

Galen C. **1999**. Why do flowers vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioScience* **49**: 631–640.

Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE. **2009**. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* **68**: 810–821.

Gallais A. **2018**. *Histoire de la Génétique et de l'amélioration des Plantes*. Versailles, FRANCE: Quae.

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.

Geraci A, Inzerillo S, Oddo E. **2019**. Physio-morphological traits and drought stress responses in three wild Mediterranean taxa of Brassicaceae. *Acta Physiologiae Plantarum* **41**:

106.
Gerard M, Michez D, Debat V, *et al.* 2018. Stressful conditions reveal decrease in size, modification of shape but relatively stable asymmetry in bumblebee wings. *Scientific Reports* **8**: 15169.
Gérard M, Vanderplanck M, Wood T, Michez D. **2020**. Global warming and plant–pollinator mismatches. *Emerging Topics in Life Sciences*.
Ghisbain G, Gérard M, Wood T, Michez D. **2021**. Expanding insect pollinators in the Anthropocene. *Biological Reviews* **accepted**.
Glenny WR, Runyon JB, Burkle LA. **2018**. Drought and increased CO_2 alter floral visual and olfactory traits with context-dependent effects on pollinator visitation. *New Phytologist* **220**: 785–798.
Gómez JM, Bosch J, Perfectti F, Fernández J d, Abdelaziz M, Camacho J p. m. **2008**. Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 2241–2249.
Gómez JM, Perfectti F, Armas C, *et al.* 2020. Within-individual phenotypic plasticity in flowers fosters pollination niche shift. *Nature Communications* **11**: 4019.
González-Varo JP, Biesmeijer JC, Bommarco R, *et al.* 2013. Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology & Evolution* **28**: 524–530.
Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. **2015**. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**.
Gracia-Lázaro C, Hernández L, Borge-Holthoefer J, Moreno Y. **2018**. The joint influence of competition and mutualism on the biodiversity of mutualistic ecosystems. *Scientific Reports* **8**: 9253.
Gray SB, Brady SM. **2016**. Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology* **419**: 64–77.
Gumbert A. **2000**. Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*): innate preferences and generalization after learning. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **48**: 36–43.
Halpern SL, Adler LS, Wink M. **2010**. Leaf herbivory and drought stress affect floral attractive and defensive traits in *Nicotiana quadrivalvis*. *Oecologia* **163**: 961–971.
Hamann E, Kesselring H, Stöcklin J. **2018**. Plant responses to simulated warming and drought: a comparative study of functional plasticity between congeneric mid and high elevation species. *Journal of Plant Ecology* **11**: 364–374.
Hao L, Guo L, Li R, *et al.* 2019. Responses of photosynthesis to high temperature stress associated with changes in leaf structure and biochemistry of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Scientia Horticulturae* **246**: 251–264.
Hatfield JL, Dold C. **2019**. Water-use efficiency: advances and challenges in a changing climate. *Frontiers in Plant Science* **10**.
Hatfield JL, Prueger JH. **2015**. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes* **10**: 4–10.
Hedhly A. **2011**. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany* **74**: 9–16.
Hegland SJ, Nielsen A, Lázaro A, Bjerknes A-L, Totland Ø. **2009**. How does climate

warming affect plant-pollinator interactions? *Ecology Letters* **12**: 184–195.
Heil M. **2011**. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* **16**: 191–200.
Hicks DM, Ouvrard P, Baldock KCR, *et al.* 2016. Food for pollinators: quantifying the nectar and pollen resources of urban flower meadows. *PLoS ONE* **11**.
Höfer RJ, Ayasse M, Kuppler J. **2021**. Bumblebee behavior on flowers, but not initial attraction, is altered by short-term drought stress. *Frontiers in Plant Science* **11**.
Høye TT, Post E, Schmidt NM, Trøjelsgaard K, Forchhammer MC. **2013**. Shorter flowering seasons and declining abundance of flower visitors in a warmer Arctic. *Nature Climate Change* **3**: 759–763.
Hrassnigg N, Crailsheim K. **2005**. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **36**: 255–277.
IPBES. **2016**. *Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production*. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, H. T. Ngo, J. C. Biesmeijer, T. D. Breeze, L. V. Dicks, L. A. Garibaldi, R. Hill, J. Settele, A. J. Vanbergen, M. A. Aizen, S. A. Cunningham, C. Eardley, B. M. Freitas, N. Gallai, P. G. Kevan, A. Kovács-Hostyánszki, P. K. Kwapong, J. Li, X. Li, D. J. Martins, G. Nates-Parra, J. S. Pettis, R. Rader, and B. F. Viana (eds.). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 36 pages.
IPBES. **2019**. *Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services*. S. Díaz, J. Settele, E. S. Brondízio E.S., H. T. Ngo, M. Guèze, J. Agard, A. Arneth, P. Balvanera, K. A. Brauman, S. H. M. Butchart, K. M. A. Chan, L. A. Garibaldi, K. Ichii, J. Liu, S. M. Subramanian, G. F. Midgley, P. Miloslavich, Z. Molnár, D. Obura, A. Pfaff, S. Polasky, A. Purvis, J. Razzaque, B. Reyers, R. Roy Chowdhury, Y. J. Shin, I. J. Visseren-Hamakers, K. J. Willis, and C. N. Zayas (eds.). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 56 pages.
IPCC. **2018**. *Global Warming of 1.5°C, an IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty*. Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.). Geneva, Switzerland. 24 pages
Jacob D, Petersen J, Eggert B, *et al.* 2014. EURO-CORDEX: new high-resolution climate change projections for European impact research. *Regional Environmental Change* **14**: 563–578.
Jacquemin F, Violle C, Rasmont P, Dufrêne M. **2017**. Mapping the dependency of crops on pollinators in Belgium. *One Ecosystem* **2**: e13738.
Ji X, Shiran B, Wan J, *et al.* 2010. Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant, Cell & Environment* **33**: 926–942.
Jin Y, Yang H, Wei Z, Ma H, Ge X. **2013**. Rice male development under drought stress: phenotypic changes and stage-dependent transcriptomic reprogramming. *Molecular*

Plant **6**: 1630–1645.
Johnson null, Steiner null. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 140–143.
Jones PL, Ryan MJ, Chittka L. 2015. The influence of past experience with flower reward quality on social learning in bumblebees. *Animal Behaviour* **101**: 11–18.
Junker RR, Parachnowitsch AL. 2015. Working towards a holistic view on flower traits-how floral scents mediate plant-animal interactions in concert with other floral characters. *Journal of the Indian Institute of Science* **95**: 43–67.
Kay KM, Picklum DA. 2013. Drought alters the expression of mating system traits in two species of *Clarkia*. *Evolutionary Ecology* **27**: 899–910.
Kehrberger S, Holzschuh A. 2019. Warmer temperatures advance flowering in a spring plant more strongly than emergence of two solitary spring bee species. *PLoS ONE* **14**: 1–15.
Kerr JT, Pindar A, Galpern P, *et al.* 2015. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science* **349**: 177–180.
Kevan PG. 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **74**: 373–393.
Khan N, Ali S, Zandi P, *et al.* 2020. Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. *Pakistan Journal of Botany* **52**.
Khan HR, Paull JG, Siddique KHM, Stoddard FL. 2010. Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crops Research* **115**: 279–286.
Kiers ET, Palmer TM, Ives AR, Bruno JF, Bronstein JL. 2010. Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecology Letters* **13**: 1459–1474.
Kingsolver JG, Huey RB. 2008. Size, temperature, and fitness: three rules. *Evolutionary Ecology Research* **10**: 251–268.
Klein A-M, Vaissiere BE, Cane JH, *et al.* 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 303–313.
Klumpers SGT, Stang M, Klinkhamer PGL. 2019. Foraging efficiency and size matching in a plant–pollinator community: the importance of sugar content and tongue length. *Ecology Letters* **22**: 469–479.
Knauer AC, Schiestl FP. 2015. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. *Ecology Letters* **18**: 135–143.
Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, St\aahl B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review* **72**: 1.
van der Kooi CJ, Dyer AG, Kevan PG, Lunau K. 2019. Functional significance of the optical properties of flowers for visual signalling. *Annals of Botany* **123**: 263–276.
Korres NE, Norsworthy JK, Tehranchian P, *et al.* 2016. Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **36**: 12.
Koti S, Reddy KR, Reddy VR, Kakani VG, Zhao D. 2005. Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. *Journal of Experimental Botany* **56**: 725–736.
Kudo G, Harder LD. 2005. Floral and inflorescence effects on variation in pollen

removal and seed production among six legume species. *Functional Ecology* **19**: 245–254.
Kuppler J, Wieland J, Junker RR, Ayasse M. **2021**. Drought-induced reduction in flower size and abundance correlates with reduced flower visits by bumble bees. *AoB PLANTS*.
Lai Y-S, Yamagishi M, Suzuki T. **2011**. Elevated temperature inhibits anthocyanin biosynthesis in the tepals of an Oriental hybrid lily via the suppression of LhMYB12 transcription. *Scientia Horticulturae* **132**: 59–65.
Lamaoui M, Jemo M, Datla R, Bekkaoui F. **2018**. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry* **6**.
Lambrecht SC, Morrow A, Hussey R. **2017**. Variation in and adaptive plasticity of flower size and drought-coping traits. *Plant Ecology* **218**: 647–660.
Latty T, Trueblood JS. **2020**. How do insects choose flowers? A review of multi-attribute flower choice and decoy effects in flower-visiting insects. *Journal of Animal Ecology* **89**: 2750–2762.
Lautenbach S, Seppelt R, Liebscher J, Dormann CF. **2012**. Spatial and temporal trends of global pollination benefit. *PLOS ONE* **7**: e35954.
Lawson T, Blatt MR. **2014**. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiology* **164**: 1556–1570.
Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, *et al.* 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**.
Lipiec J, Doussan C, Nosalewicz A, Kondracka K. **2013**. Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: a review. *International Agrophysics* **27**: 463–477.
Lunau K. **1991**. Innate flower recognition in bumblebees (*Bombus terrestris*, *B. lucorum*; Apidae): optical signals from stamens as landing reaction releasers. *Ethology* **88**: 203–214.
MacArthur RH, Pianka ER. **1966**. On optimal use of a patchy environment. *The American Naturalist* **100**: 603–609.
Marcelis LF. **1996**. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* **47 Spec No**: 1281–1291.
Martinet B, Dellicour S, Ghisbain G, *et al.* 2020. Global effects of extreme temperatures on wild bumblebees. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*.
Martinet B, Zambra E, Przybyla K, *et al.* 2021. Mating under climate change: Impact of simulated heatwaves on the reproduction of model pollinators. *Functional Ecology* **35**: 739–752.
Maxwell K, Johnson GN. **2000**. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659–668.
McCarty JP. **2001**. Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology* **15**: 320–331.
Memmott J. **2009**. Food webs: a ladder for picking strawberries or a practical tool for practical problems? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 1693–1699.
Memmott J, Waser NM, Price MV. **2004**. Tolerance of pollination networks to species extinctions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **271**: 2605–2611.

Menzel A, Sparks TH, Estrella N, *et al.* 2006. European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biology* **12**: 1969–1976.
Mesihovic A, Iannacone R, Firon N, Fragkostefanakis S. 2016. Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant Reproduction* **29**: 93–105.
Michener CD. 2007. *The bees of the world*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.
Michez D, Rasmont P, Terzo M, Vereecken N. 2019. *Abeilles d'Europe – Hyménoptères d'Europe – Tome 1*. Verrières-le-Buisson, France: NAP Editions.
Miller-Struttmann NE, Geib JC, Franklin JD, *et al.* 2015. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science* **349**: 1541–1544.
Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15–19.
Moerman R, Roger N, Jonghe RD, Michez D, Vanderplanck M. 2016. Interspecific Variation in Bumblebee Performance on Pollen Diet: New Insights for Mitigation Strategies. *PLOS ONE* **11**: e0168462.
Moerman R, Vanderplanck M, Roger N, *et al.* 2015. Growth rate of bumblebee larvae is related to pollen amino acids. *Journal of Economic Entomology* **109**: 25–30.
Morrison MJ, Stewart DW. 2002. Heat stress during flowering in summer *Brassica*. *Crop Science* **42**: 797–803.
Mu J, Peng Y, Xi X, *et al.* 2015. Artificial asymmetric warming reduces nectar yield in a Tibetan alpine species of Asteraceae. *Annals of Botany* **116**: 899–906.
Muhammad I, Shalmani A, Ali M, Yang Q-H, Ahmad H, Li FB. 2021. Mechanisms regulating the dynamics of photosynthesis under abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **11**.
Muhl QE, Toit ES du, Steyn JM, Apostolides Z. 2014. Bud development, flowering and fruit set of *Moringa oleifera* Lam. (Horseradish Tree) as affected by various irrigation levels. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics (JARTS)* **114**: 79–87.
Müller A, Diener S, Schnyder S, Stutz K, Sedivy C, Dorn S. 2006. Quantitative pollen requirements of solitary bees: Implications for bee conservation and the evolution of bee–flower relationships. *Biological Conservation* **130**: 604–615.
Naug D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation* **142**: 2369–2372.
Naug D, Arathi HS. 2007. Receiver bias for exaggerated signals in honeybees and its implications for the evolution of floral displays. *Biology Letters* **3**: 635–637.
Nepi M, Grasso DA, Mancuso S. 2018. Nectar in plant–insect mutualistic relationships: from food reward to partner manipulation. *Frontiers in Plant Science* **9**.
Nicolson SW. 2009. Water homeostasis in bees, with the emphasis on sociality. *Journal of Experimental Biology* **212**: 429–434.
Nicolson SW. 2011. Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology* **46**: 197–204.
Nicolson, Susan W. 2007. Nectar consumers In: *Nectaries and Nectar*. Springer Netherlands, 289–342.
Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, *et al.* 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing

climate. *Trends in Plant Science* **15**: 684–692.
Nieto A, Roberts SPM, Kemp J, *et al.* 2014. *European red list of bees*. Luxembourg: Publications Office.
Ogilvie JE, Griffin SR, Gezon ZJ, *et al.* 2017. Interannual bumble bee abundance is driven by indirect climate effects on floral resource phenology. *Ecology Letters* **20**: 1507–1515.
Ollerton J. 2017. Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **48**: 353–376.
Ollerton J, Alarcón R, Waser NM, *et al.* 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* **103**: 1471–1480.
Ollerton J, Killick A, Lamborn E, Watts S, Whiston M. 2007. Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon* **56**: 717–728.
Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* **120**: 321–326.
Opedal ØH, Listemann J, Albertsen E, Armbruster WS, Pélabon C. 2016. Multiple effects of drought on pollination and mating-system traits in *Dalechampia scandens*. *International Journal of Plant Sciences* **177**: 682–693.
Orians CM, Schweiger R, Dukes JS, Scott ER, Müller C. 2019. Combined impacts of prolonged drought and warming on plant size and foliar chemistry. *Annals of Botany* **124**: 41–52.
Ouvrard P, Transon J, Jacquemart A-L. 2018. Flower-strip agri-environment schemes provide diverse and valuable summer flower resources for pollinating insects. *Biodiversity and Conservation* **27**: 2193–2216.
Ovaskainen O, Skorokhodova S, Yakovleva M, *et al.* 2013. Community-level phenological response to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 13434–13439.
Pacini E, Dolferus R. 2019. Pollen developmental arrest: maintaining pollen fertility in a world with a changing climate. *Frontiers in Plant Science* **10**.
Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003. Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* **238**: 7–21.
Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M. 2015. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **6**: 723.
Parachnowitsch AL, Manson JS, Sletvold N. 2019. Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany* **123**: 247–261.
Parmesan C. 2007. Influences of species, latitudes and methodologies on estimates of phenological response to global warming. *Global Change Biology* **13**: 1860–1872.
Parmesan C, Hanley ME. 2015. Plants and climate change: complexities and surprises. *Annals of Botany* **116**: 849–864.
Pasquale GD, Alaux C, Conte YL, *et al.* 2016. Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PLOS ONE* **11**: e0162818.
Pasquale GD, Salignon M, Conte YL, *et al.* 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLOS ONE* **8**: e72016.
Paupière MJ, Müller F, Li H, *et al.* 2017. Untargeted metabolomic analysis of tomato

pollen development and heat stress response. *Plant Reproduction* **30**: 81–94.
Peitsch D, Fietz A, Hertel H, de Souza J, Ventura DF, Menzel R. **1992**. The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **170**: 23–40.
Phillips BB, Shaw RF, Holland MJ, *et al.* 2018. Drought reduces floral resources for pollinators. *Global Change Biology* **24**: 3226–3235.
Pincebourde S, van Baaren J, Rasmann S, *et al.* 2016. Plant–insect interactions in a changing world. *Advances in Botanical Research* **81**: in press.
Pires MM, O'Donnell JL, Burkle LA, *et al.* 2020. The indirect paths to cascading effects of extinctions in mutualistic networks. *Ecology* **101**: e03080.
Poorter H, Anten NPR, Marcelis LFM. **2013**. Physiological mechanisms in plant growth models: do we need a supra-cellular systems biology approach? *Plant, Cell & Environment* **36**: 1673–1690.
Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. **2010**. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 345–353.
Powney GD, Carvell C, Edwards M, *et al.* 2019. Widespread losses of pollinating insects in Britain. *Nature Communications* **10**: 1018.
Prasad PVV, Staggenborg SA, Ristic Z. **2008**. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of crops to limited water: understanding and modeling water stress effects on plant growth processes*: 301–355.
Proctor M. **1973**. *The pollination of flowers*. London: Collins.
Pyke GH, Thomson JD, Inouye DW, Miller TJ. **2016**. Effects of climate change on phenologies and distributions of bumble bees and the plants they visit. *Ecosphere* **7**: e01267.
Rafferty NE, Ives AR. **2011**. Effects of experimental shifts in flowering phenology on plant–pollinator interactions. *Ecology Letters* **14**: 69–74.
Rering CC, Franco JG, Yeater KM, Mallinger RE. **2020**. Drought stress alters floral volatiles and reduces floral rewards, pollinator activity, and seed set in a global plant. *Ecosphere* **11**: e03254.
Reyer CPO, Leuzinger S, Rammig A, *et al.* 2013. A plant's perspective of extremes: terrestrial plant responses to changing climatic variability. *Global Change Biology* **19**: 75–89.
Rizhsky L, Liang H, Mittler R. **2002**. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* **130**: 1143–1151.
Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. **2004**. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**: 1683–1696.
Rotheray EL, Osborne JL, Goulson D. **2017**. Quantifying the food requirements and effects of food stress on bumble bee colony development. *Journal of Apicultural Research* **56**: 288–299.
Roulston TH, Cane JH. **2000**. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 187–209.
Roulston TH, Cane JH, Buchmann SL. **2000**. What governs protein content of

pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs* **70**: 617–643.
Roy R, Schmitt AJ, Thomas JB, Carter CJ. **2017**. Review: Nectar biology: From molecules to ecosystems. *Plant Science* **262**: 148–164.
Ruedenauer FA, Leonhardt SD, Schmalz F, Rössler W, Strube-Bloss MF. **2017**. Separation of different pollen types by chemotactile sensing in *Bombus terrestris*. *Journal of Experimental Biology* **220**: 1435–1442.
Ruedenauer FA, Spaethe J, Leonhardt SD. **2015**. How to know which food is good for you: bumblebees use taste to discriminate between different concentrations of food differing in nutrient content. *Journal of Experimental Biology* **218**: 2233–2240.
Saddhe AA, Manuka R, Penna S. **2021**. Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. *Physiologia Plantarum* **171**: 739–755.
Sainz M, Díaz P, Monza J, Borsani O. **2010**. Heat stress results in loss of chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase and increased damage to Photosystem II in combined drought-heat stressed *Lotus japonicus*. *Physiologia Plantarum* **140**: 46–56.
Sala OE. **2000**. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* **287**: 1770–1774.
Sánchez-Bayo F, Wyckhuys KA. **2019**. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological conservation* **232**: 8–27.
Sato S, Kamiyama M, Iwata T, Makita N, Furukawa H, Ikeda H. **2006**. Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of lycopersicon esculentum by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany* **97**: 731–738.
Scaven VL, Rafferty NE. **2013**. Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Current zoology* **59**: 418–426.
Scheepens JF, Deng Y, Bossdorf O. **2018**. Phenotypic plasticity in response to temperature fluctuations is genetically variable, and relates to climatic variability of origin, in *Arabidopsis thaliana*. *AoB PLANTS* **10**.
Schiestl FP, Johnson SD. **2013**. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution* **28**: 307–315.
Schleuning M, Fründ J, Schweiger O, *et al.* 2016. Ecological networks are more sensitive to plant than to animal extinction under climate change. *Nature Communications* **7**: 1–9.
Schweiger O, Biesmeijer JC, Bommarco R, *et al.* 2010. Multiple stressors on biotic interactions: how climate change and alien species interact to affect pollination. *Biological Reviews* **85**: 777–795.
Sehgal A, Sita K, Bhandari K, *et al.* 2019. Influence of drought and heat stress, applied independently or in combination during seed development, on qualitative and quantitative aspects of seeds of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes, differing in drought sensitivity. *Plant, Cell & Environment* **42**: 198–211.
Seibold S, Gossner MM, Simons NK, *et al.* 2019. Arthropod decline in grasslands and forests is associated with landscape-level drivers. *Nature* **574**: 671–674.
Settele J, Bishop J, Potts SG. **2016**. Climate change impacts on pollination. *Nature Plants* **2**: 16092.

Settele J, Scholes R, Betts R, *et al.* 2014. Terrestrial and inland water systems In: *Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability*. Cambridge: Cambridge University Press, 271–359.

Shaar-Moshe L, Hayouka R, Roessner U, Peleg Z. **2019**. Phenotypic and metabolic plasticity shapes life-history strategies under combinations of abiotic stresses. *Plant Direct* **3**: e00113.

Shavrukov Y, Kurishbayev A, Jatayev S, *et al.* 2017. Early flowering as a drought escape mechanism in plants: how can it aid wheat production? *Frontiers in Plant Science* **8**: 1950.

Simanonok MP, Otto CRV, Smart MD. **2020**. Do the quality and quantity of honey bee-collected pollen vary across an agricultural land-use gradient? *Environmental Entomology* **49**: 189–196.

Slette IJ, Post AK, Awad M, *et al.* 2019. How ecologists define drought, and why we should do better. *Global Change Biology* **25**: 3193–3200.

Smith AR, Zhao D. **2016**. Sterility caused by floral organ degeneration and abiotic stresses in arabidopsis and cereal grains. *Frontiers in Plant Science* **7**.

Snider JL, Oosterhuis DM. **2011**. How does timing, duration, and severity of heat stress influence pollen-pistil interactions in angiosperms? *Plant Signaling & Behavior* **6**: 930–933.

Soares RGS, Ferreira PA, Lopes LE. **2017**. Can plant-pollinator network metrics indicate environmental quality? *Ecological Indicators* **78**: 361–370.

Solís-Montero L, Vallejo-Marín M. **2017**. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. *Ecology and Evolution* **7**: 2706–2715.

Somme L, Vanderplanck M, Michez D, *et al.* 2014. Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie* **46**: 92–106.

Soroye P, Newbold T, Kerr J. **2020**. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. *Science* **367**: 685–688.

Spinoni J, Vogt JV, Naumann G, Barbosa P, Dosio A. **2018**. Will drought events become more frequent and severe in Europe? *International Journal of Climatology* **38**: 1718–1736.

Sprayberry JDH. **2018**. The prevalence of olfactory- versus visual-signal encounter by searching bumblebees. *Scientific Reports* **8**: 14590.

Stanton ML, Preston RE. **1988**. Ecological consequences and phenotypic correlates of petal size variation in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **75**: 528–539.

Su Z, Ma X, Guo H, *et al.* 2013. Flower development under drought stress: morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 3785–3807.

Suni SS, Ainsworth B, Hopkins R. **2020**. Local adaptation mediates floral responses to water limitation in an annual wildflower. *American Journal of Botany* **107**: 209–218.

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R. **2014**. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* **203**: 32–43.

Svoboda JA, Thompson MJ, Robbins WE, Kaplanis JN. **1978**. Insect steroid metabolism. *Lipids* **13**: 742–753.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. **2015**. *Plant physiology and development*. Sinauer Associates Incorporated.
Takkis K, Tscheulin T, Petanidou T. **2018**. Differential effects of climate warming on the nectar secretion of early- and late-flowering Mediterranean plants. *Frontiers in Plant Science* **9**.
Takkis K, Tscheulin T, Tsalkatis P, Petanidou T. **2015**. Climate change reduces nectar secretion in two common Mediterranean plants. *AoB Plants* **7**: plv111.
Tambussi E a., Bort J, Araus J l. **2007**. Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology* **150**: 307–321.
Teixido AL, Barrio M, Valladares F. **2016**. Size matters: understanding the conflict faced by large flowers in mediterranean environments. *The Botanical Review* **82**: 204–228.
Teixido AL, Valladares F. **2019**. Heat and drought determine flower female allocation in a hermaphroditic Mediterranean plant family. *Plant Biology* **21**: 1024–1030.
Thalmann M, Santelia D. **2017**. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytologist* **214**: 943–951.
Thompson JN, Cunningham BM. **2002**. Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature* **417**: 735–738.
Turner LB. **1993**. The effect of water stress on floral characters, pollination and seed set in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **44**: 1155–1160.
Vanderplanck M, Martinet B, Carvalheiro LG, *et al.* 2019. Ensuring access to high-quality resources reduces the impacts of heat stress on bees. *Scientific Reports* **9**.
Vanderplanck M, Moerman R, Rasmont P, *et al.* 2014. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PLoS ONE* **9**: e86209.
Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM. **2015**. Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science* **10**: 133–141.
Vaudo AD, Tooker JF, Patch HM, *et al.* 2020. Pollen protein: lipid macronutrient ratios may guide broad patterns of bee species floral preferences. *Insects* **11**: 132.
Vile D, Pervent M, Belluau M, *et al.* 2012. *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? *Plant, Cell & Environment* **35**: 702–718.
Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR. **2007**. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**: 199–223.
Wallisdevries MF, Van Swaay CAM, Plate CL. **2012**. Changes in nectar supply: A possible cause of widespread butterfly decline. *Current Zoology* **58**: 384–391.
Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J. **1996**. Generalization in Pollination Systems, and Why it Matters. *Ecology* **77**: 1043–1060.
Waser NM, Price MV. **2016**. Drought, pollen and nectar availability, and pollination success. *Ecology* **97**: 1400–1409.
Willmer P. **2011**. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press.
Woodard SH. **2017**. Bumble bee ecophysiology: integrating the changing environment and the organism. *Current Opinion in Insect Science* **22**: 101–108.
Woodard SH, Jha S. **2017**. Wild bee nutritional ecology: predicting pollinator population dynamics, movement, and services from floral resources. *Current Opinion in Insect Science*

21: 83–90.
Wright GA, Schiestl FP. **2009**. The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Functional Ecology* **23**: 841–851.
Xu Y, Huang B. **2007**. Heat-induced leaf senescence and hormonal changes for thermal bentgrass and turf-type bentgrass species differing in heat tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**: 185–192.
Yamori W, Hikosaka K, Way DA. **2014**. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research* **119**: 101–117.
Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A. **2018**. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* **162**: 2–12.
Zhang S-S, Yang H, Ding L, *et al.* 2017. Tissue-specific transcriptomics reveals an important role of the unfolded protein response in maintaining fertility upon heat stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **29**: 1007–1023.
Zhao Z, Lu N, Conner JK. **2016**. Adaptive pattern of nectar volume within inflorescences: bumblebee foraging behavior and pollinator-mediated natural selection. *Scientific Reports* **6**.
Zhao D, Tao J. **2015**. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science* **6**.
Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF. **2010**. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*: erq053.

Chapter 1 : The effects of drought on plant-pollinator interactions : what to expect?

Cette revue de littérature a été réalisée afin de synthétiser les effets de la sécheresse sur les traits floraux, les récompenses florales et les modifications potentielles du comportement des pollinisateurs. Ce chapitre a été publié.

Descamps, C., Quinet, M. & Jacquemart, A. L. (2021). The effects of drought on plant–pollinator interactions : what to expect? *Environmental and Experimental Botany*, *182*, 104297. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104297

Au moment de la rédaction, aucune revue de littérature sur ce thème n'était disponible, alors que les effets des hausses de température avaient été traités dans deux revues de littérature (Scaven and Rafferty 2013; Gérard *et al.* 2020).

Depuis lors, une méta-analyse sur le même thème que cette revue de littérature est sortie, venant appuyer les conclusions soutenues avec les données de 40 études qui ont été rassemblées (Kuppler and Kotowska 2021).

The effects of drought on plant–pollinator interactions: what to expect?

Charlotte Descamps, Muriel Quinet, Anne-Laure Jacquemart

Earth and Life Institute–Agronomy, UCLouvain, Croix du Sud 2, box L7.05.14, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

Correspondence : Charlotte Descamps, email: charlotte.descamps@uclouvain.be

Descamps, C., Quinet, M. & Jacquemart, A. L. (2021). The effects of drought on plant–pollinator interactions: what to expect? *Environmental and Experimental Botany*, *182*, 104297. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104297

Abstract

Current predictions suggest that in temperate zones climate change will increase the frequency of extreme events such as summer droughts, leading to deficit in water availability for ecosystems. Plants will more often experience water stress during the spring and summer. The effects of drought on plants in these systems have predominantly been studied in wind-pollinated crop species, focusing on vegetative growth or yield. Although a majority of flowering plants (87% of all angiosperms) is insect-pollinated, the effects of drought on plant–pollinator interactions are not well studied. However, plant pollination and reproduction phases are highly sensitive to this abiotic stress. At plant individual scale, we hypothesize that drought will alter plant–pollinator interactions via (i) signals or cues for insect visitors (floral display, plant height, number of flowers per plant, flower color, shape and size, olfactory compound quantity and composition) and (ii) floral rewards (nectar volume, total sugar concentration, sugar composition, pollen quantity and chemical composition). In this review, we synthesize evidence related to the effects of drought on floral signals and rewards, and discuss how they may disrupt plant–pollinator relationships.

Keywords : plant–pollinator interaction, drought, water stress, pollination, climate change, floral signals, flower, pollen, nectar, seed set

1. Introduction

Under climate change, extreme climatic events such as droughts are projected to increase in frequency, duration and severity (Dai 2013; IPCC 2014; EEA 2017). In temperate regions, the consequences of water deficit during the peak growing months are particularly unclear, since temperate ecosystems are adapted to regular rainfall throughout the year (Spinoni *et al.* 2018). In these regions, drought in the spring and summer may be harmful for plant–pollinator systems, since these are crucial periods for the growth and reproduction of both flowering plants and their pollinators (Settele *et al.* 2016). Drought-induced reductions in productivity during these months are thus a major threat to plant–pollinator interactions (Potts *et al.* 2010; Brown *et al.* 2016; Nicholson and Egan 2020). In this review, we discuss how changes in floral signals and rewards due to drought may affect plant and pollinator reproductive success.

The effects of drought on plant physiology are relatively well studied in cropping systems, due to the importance of crop yields for global food security (Pinheiro and Chaves 2011; Osakabe *et al.* 2014; Fahad *et al.* 2017). Water deficit reduces photosynthetic rate (Pinheiro and Chaves 2011), leading to a reduction in resources available for investment in reproduction (Lemoine *et al.* 2013). However, the effects of drought on plant–pollinator interactions are not as well understood. Approximately 75% of all crop species used for human consumption worldwide require insect pollination (Klein *et al.* 2007), and the

proportion of total agricultural area occupied by insect pollinator-dependent crops has regularly increased from 1961–2016 (Aizen *et al.* 2019). Understanding the impacts of drought on insect-pollinated species and plant–pollinator interactions is an economically important, but drastically overlooked issue. If pollinator decline is a hazard for agricultural productivity, it is not less dangerous for wild plants. This ecosystem service is crucial for biodiversity conservation ; pollinators maintain plant communities, through producing fruit and seeds which support a large part of biodiversity and endangered species (Perring and Farrell 1977; IPBES 2016). About 78% of plant species are pollinated by animals in temperate regions (Ollerton *et al.* 2011), and these animals are largely dominated by insects, especially bees (IPBES 2016).

Mismatches between plants and their pollinators can occur due to climate change and particularly due to extreme events such as drought (Fig. 8). They are observed in terms of distribution and phenology, causing potential spatial and temporal mismatches (Bartomeus *et al.* 2011; Pyke *et al.* 2016; Cohen *et al.* 2018; reviewed in Forrest 2015). Changes are also observed in terms of morphology and/or attractiveness between plants and pollinators, causing potential morphological and recognition mismatches, (Miller-Struttmann *et al.* 2015; Descamps *et al.* 2020; Gérard *et al.* 2020). At individual level, floral signals such as color, shape and scent influence flower attractiveness and can signal the reward status of the flower to a pollinator (Gómez *et al.* 2008; Knauer and Schiestl 2015, Delle-Vedove *et al.* 2017). Rewards consist of nectar, the main sugar source, and pollen, the main source of amino acids, proteins and lipids (Nicolson and Susan 2007; Cane 2016). All of these floral traits related to attracting and provisioning pollinators can be altered by drought (Byers 2017). For instance, it has been suggested that indirect effects of climatic changes, such as the modifications of floral signals and rewards due to drought, may be more severe than direct effects on pollinators (Ogilvie *et al.* 2017; Ropars *et al.* 2020). Because of the dependency of plants and their pollinators, drought can potentially be harmful for both partners of the interactions, reducing plant and pollinator reproductive success (Fig. 9). In this opinion, we will review the impact of drought on floral traits and rewards and the consequence on plant-pollinators interactions.

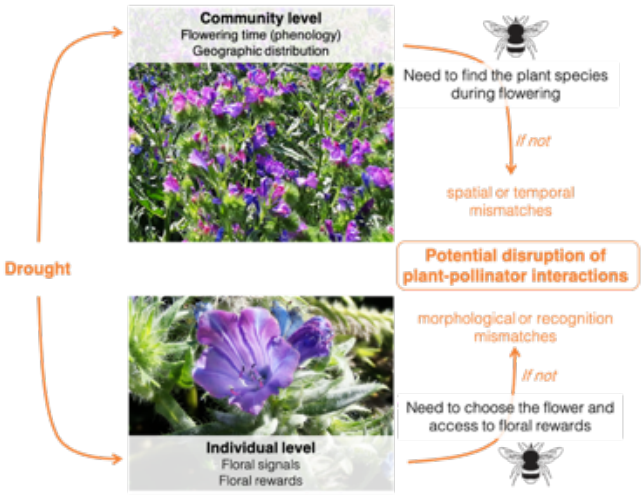


Figure 2 : Potential impacts of drought on plant-pollinator interactions at community level and at plant individual level. At community level, drought may influence flowering time and/or geographic distribution of plant species, which may create temporal and/or spatial mismatches between plant species and insect pollinators if they don't find the plant species in their environment when they emerge in spring or summer. At individual level, drought may influence floral signals and/or rewards, which may create morphological and/or recognition mismatches between plant species and insect pollinators if they change their foraging behavior or if their morphology do not allow them to forage on drought-modified flowers.

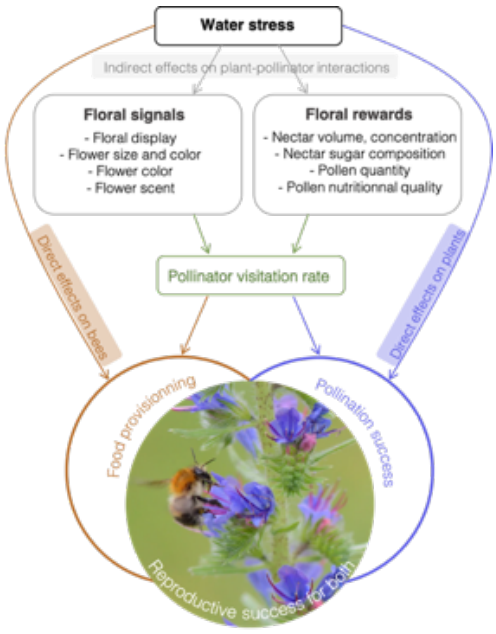


Figure 3 : Path diagram showing direct and indirect links among water stress and reproductive success for both plants and pollinators. Water stress could affect bees and plants both directly (brown and blue arrows) and indirectly through their effects on floral rewards and signals (grey arrows) which has consequences for pollinator visitation rate (green arrows).

2. Methods

Our synthesis focuses exclusively on the reported impacts of drought on floral signals and rewards for insect-pollinated species at plant individual level (Fig. 8). Drought is usually defined by climatology publications as "an abnormal water deficit" (Slette et al. 2019) and an ecological definition of drought is given by Crausbay et al. (2017) as "an episodic deficit in water availability that drives ecosystems beyond thresholds of vulnerability, impacts ecosystem services, and triggers feedbacks in natural and/or human systems". In our review, we considered drought as a reduction of water availability, which can negatively affect plants and pollinators, causing potentially water stress for both of them. We included in our selection studies which concern variation in water availability (artificially or naturally generated) in order to extract information about the consequences on floral traits and rewards, even if these studies did not refer strictly to drought situations by their episodic character. To select papers which concern "drought" impact, we searched on Scopus (November 2019-April 2020) with these keywords : "drought", "dry environment", "soil moisture", "water availability/reduction/decrease", "water stress" linking with floral traits and rewards ("floral display", "flower number", "flower height", "flower size/shape/color/scent", "olfactory compounds", "VOCs", "nectar concentration", "nectar quantity", "pollen quantity", "pollen viability"). For consistent comparisons among vegetation types, we limited the analysis to non-tree species and to insect-pollinated species. We selected papers based on the abstract reading, papers that concern only vegetative parameters or only yield impact were not considered. Our analysis is drawn from 55 papers (Table S1) including drought effects on 99 insect-pollinated species from 26 plant families (Table 2). We discuss the current state of knowledge about drought effects on plant cues, and propose perspectives for future research. A conceptual pathway diagram (Fig. 9) synthesizes the direct and indirect links between drought and reproductive success for both partners, i.e. plants and pollinators.

3. Results

3.1. Results depend on the methods used

We observed a variety of different protocols for measuring the effects of drought in the literature. Most studies quantified drought by measuring soil water content (42%, Fig. 10A), and most studies were also performed in greenhouses under controlled conditions (64%, Fig. 10B). Experimental drought varied also in the stress imposition method from, for example, no watering during 5 weeks to moderate watering once a week. Stress intensity may have been too low in cases, which could explain the absence of measurable effects (see Phillips *et al.* 2018). The intensity of stress is also qualified differently depending on the studies and the studied species. For example, "severe drought" conditions were considered as 30% soil water content for *Arabidopsis thaliana* (Ma et al

2014) while soil water content was below 15% in water stressed plants for *Borago officinalis* (Descamps et al 2018). Due to the large number of variables involved in experimental drought studies, comparisons across experiments are difficult.

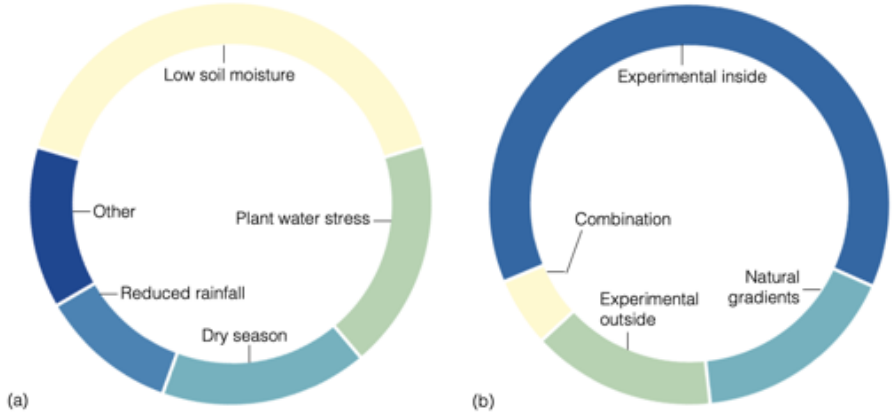


Figure 4 : Diversity of selected water-stress studies (N=55) in terms of (a) water stress application method according Slette et al. (2019) and (b) experimental setups. (a) Studies quantified water stress mainly by measuring soil water content (low soil moisture, N=23), to a lesser extent, by analyzing plant water stress, such as measuring the wilting point (N=10), (3) performing observations in dry seasons with less precipitation (N=9), reducing rainfall quantity (reduced rainfall, N=6) or by other method such as calculating index of water stress or for some studies or by describing "dry conditions" without any details (other, N=7). (b) Studies were performed under controlled conditions in greenhouses (N=35), or by doing observations along natural gradients, for example, from coastal regions to mountain (N=9), or by simulating drought events with shelter in natural plant population outside (N=8), or by combining several setups described above (N=3).

Table 1 : List of family and species covered by the 55 selected studies ; crop species are indicated by an asterisk.

Family	**Species**
Alliaceae	*Allium cepa**
Asclepiadaceae	*Asclepias syriaca, A. exaltata*
Asteraceae	*Achillea millefolium, Chrysanthemum leucanthemum, Dorycnium pentaphyllum, Heterotheca villosa, Hypochaeris radicata, Madia sativa*
Balsaminaceae	*Impatiens capensis, I. parviflora*
Boraginaceae	*Borago offinicalis, Echium plantagineum, E. vulgare, Mertensia ciliata, Phacelia hastata*
Brassicaceae	*Arabidopsis thaliana, Brassica napus*, B. rapa*
Campanulaceae	*Campanula rotundifolia*
Calochortaceae	*Calochortus subalpinus*
Caryophyllaceae	*Silene littorea, S. vulgaris*
Cistaceae	Many species (N=37), *Helianthemum syriacum*
Ericaceae	*Calluna vulgaris, Erica multiflora*

Euphorbiaceae	*Dalechampia scandens*
Fabaceae	*Chamaecrista fasciculata, Cicer arietinum*, Lathyrus pratensis, Lens culinaris*, Onobrychis viciifolia, Phaseolus vulgaris*, Pisum sativum*, Prunella vulgaris, Senna candollena, Trifolium pratense, T. repens, Trigonella moabitica*
Geraniaceae	*Pelargonium hortorum*
Lamiaceae	*Rosmarinus officinalis*
Lobeliaceae	*Lobelia siphilitica*
Lythraceae	*Lythrum salicaria*
Myrtaceae	*Leptospermum scoparium*
Onagraceae	*Clarkia breweri, C. concinna, Epilobium angustifolium*
Phrymaceae	*Mimulus guttatus, M. nasutus*
Plantaginaceae	*Collinsia heterophylla, Globularia alypum*
Polemionaceae	*Ipomopsis aggregata, I. longiflora, Leptosiphon androsaceus, Phlox drummondii, Polemonium viscosum*
Ranunculaceae	*Aquilegia coerulea*
Rosaceae	*Fragaria virginiana, Potentilla recta*
Scrophulariaceae	*Scrophularia californica*
Solanaceae	*Nicotiana quadrivalis*, Solanum lycopersicon**

We found that the precise timing of stress application was not systematically specified in studies. Even if all stages of reproductive phase are sensitive to abiotic stress (Prasad *et al.* 2008), the early stage, bolting and anthesis, are highly sensitive (El Balla *et al.* 2013). We thus recommend experimental conditions be clearly explained, including the precise timing, phase and duration of stress application. This challenge has been highlighted recently by Slette *et al.* (2019) and we strongly suggest following its recommendations regarding the information to be mentioned when studying drought effects.

3.2. Changes in floral signals decrease plant attractiveness

Table 2 : Effect of water stress on floral signals and floral rewards : ↘ decrease ; ○ no effect ; ↗ increase ; ⊛ modification ; in brackets, the first number indicated the number of studies, the second number indicated the number of species concerned.

Category	Modification	Water stress effect	Reference
Floral signals			
--Floral display	Plant height	↘ (16 ; 17)	(Boutraa and Sanders 2001; Mal and Lovett-Doust 2005; Caruso 2006; Sánchez-Blanco *et al.* 2009; Al-Ghzawi *et al.* 2009; Qaderi *et al.* 2012; Edwards *et al.* 2012; Quinet *et al.* 2015; Lázaro-Nogal *et al.* 2015; Burkle and Runyon 2016; Gonzáles *et al.* 2016; Lambrecht *et al.* 2017; Glenny *et al.* 2018; Kahl *et al.* 2019; Descamps *et al.* 2020; Walter 2020)
		○ (4;6)	(Burkle and Runyon 2016; Descamps *et al.* 2018, 2020; Glenny *et al.* 2018)
	Flower or inflorescence number	↘ (21;25)	(Peñuelas *et al.* 2004; Caruso 2006; Prieto *et al.* 2008; Sánchez-Blanco *et al.* 2009; Al-Ghzawi *et al.* 2009; Fang *et al.* 2010; Su *et al.* 2013; El Balla *et al.* 2013; del Cacho *et al.* 2013; Ma *et al.* 2014; Thomson 2016; Burkle and Runyon 2016; Gonzáles *et al.* 2016; Descamps *et al.* 2018; Glenny *et al.* 2018; Phillips *et al.* 2018; Kahl *et al.* 2019; Brunet and Van Etten 2019; Descamps *et al.* 2020; Walter 2020; Suni *et al.* 2020) // Flower abortion : (Fang *et al.* 2010; Guo *et al.* 2013; Descamps *et al.* 2018)
		○ (6;9)	(Caruso 2006; Prieto *et al.* 2008; del Cacho *et al.* 2013; Gallagher and Campbell 2017; Glenny *et al.* 2018; Phillips *et al.* 2018)

	Floral longevity	 (2;2)	(Arathi *et al.* 2002; Jorgensen and Arathi 2013)
--Flower parameters	Color	 (2;2)	(Sánchez-Blanco *et al.* 2009; del Valle *et al.* 2015)
		 (1;1)	(Brunet and Van Etten 2019)
	Size of flower or inflorescence	 (21;30)	(Villarreal and Freeman 1990; Frazee and Marquis 1994; Carroll *et al.* 2001; Mal and Lovett-Doust 2005; Herrera 2005; Caruso 2006; Lambrecht and Dawson 2007; Halpern *et al.* 2010; Edwards *et al.* 2012; El Balla *et al.* 2013; Guo *et al.* 2013; Opedal *et al.* 2016; Burkle and Runyon 2016; Gonzáles *et al.* 2016; Gallagher and Campbell 2017; Lambrecht *et al.* 2017; Descamps *et al.* 2018, 2020; Glenny *et al.* 2018; Mantel and Sweigart 2019; Brunet and Van Etten 2019; Suni *et al.* 2020)
		 (3;4)	(Caruso 2006; Kay and Picklum 2013; Walter 2020)
	VOCs quantity	 (3;3)	(Burkle and Runyon 2016; Glenny *et al.* 2018; Campbell *et al.* 2019)
		 (2;2)	(Burkle and Runyon 2016; Glenny *et al.* 2018)
	VOCs composition	 (2;4)	(Burkle and Runyon 2016; Campbell *et al.* 2019)

Floral rewards

--Nectar	Nectar volume	 (10;11)	(Villarreal and Freeman 1990; Wyatt *et al.* 1992; Carroll *et al.* 2001; Halpern *et al.* 2010; Waser and Price 2016; Gallagher and Campbell 2017; Descamps *et al.* 2018, 2020; Brunet and Van Etten 2019; Suni *et al.* 2020) // Nectarless flowers : (Phillips *et al.* 2018)
		 (2;4)	(Phillips *et al.* 2018; Descamps *et al.* 2020)
		 (1;1)	(Suni *et al.* 2020)
	Nectar concentration	 (8;10)	(Villarreal and Freeman 1990; Carroll *et al.* 2001; Halpern *et al.* 2010; Gallagher and Campbell 2017; Descamps *et al.* 2018, 2020; Phillips *et al.* 2018; Brunet and Van Etten 2019)
		 (1,1)	(Descamps *et al.* 2020)
	Nectar sugar content per flower	 (1,1)	(Suni *et al.* 2020)
		 (2;2)	(Clearwater *et al.* 2018; Descamps *et al.* 2020)
		 (4;4)	(Waser and Price 2016; Descamps *et al.* 2018, 2020; Suni *et al.* 2020)
	Nectar sucrose composition	 (2;2)	(Villarreal and Freeman 1990; Clearwater *et al.* 2018)

--Pollen	Pollen quantity	↘ (1;1)	(Waser and Price 2016)
		○ (2;2)	(Galen 2000; Descamps *et al.* 2018)
	Pollen viability	↘ (5;5)	(Turner 1993; Al-Ghzawi *et al.* 2009; Fang *et al.* 2010; Su *et al.* 2013; Descamps *et al.* 2018)
		○ (1;1)	(Guo *et al.* 2013)

Table 3 : Effect of water stress on floral signals and/or floral rewards and their consequence on pollinator visitation rate. ↘ decrease ; ○ no effect ; ↗ increase ; ⊛ modification

Reference	Modified signals or rewards due to water stress	Pollinators observed		Effect on pollinator visitation rate
(Al-Ghzawi *et al.* 2009)	Plant height, flower number, pollen viability	Honey bees ; wild bees	↘	Honey bees : on average, 75% of worker honey bees visited flowers of well-watered plants, whereas 20% of worker honey bees visited flowers of moderately-watered plants. Drought-stressed flowers had low (5%) honey bee workers visits. Wild bees made 80% of their visits to flowers of well-watered plants, whereas 15% and 10% of the total visits were directed towards flowers of moderately-watered and drought stressed plants, respectively.

(Burkle and Runyon 2016)	Plant height, flower number, flower size, VOC quantity, VOC composition	88% bees (Apoidea), 12% other (flies, butterflies)		For *Campanula rotundifolia*: pollinator visits per flower and per plant decreased by half; for *Potentilla recta*: drought drastically reduced per-plant pollinator visitation 22.5-fold.
				For *Heterotheca villosa*, no effect.
				For *Phacelia hastata* : drought increased per-flower visitation 10-fold.
(Waser and Price 2016)	Nectar volume, nectar sucrose quantity, pollen quantity	Hummingbird		Visit rate increase (nectar production decrease → visit length decrease and flower visited increase); pollen load per flower decrease (pollen quantity decrease).
(Gallagher and Campbell 2017)	Flower size, nectar volume	303 pollinators observed, two were flies, eight were solitary bees and the rest were bumblebees		We found strong evidence for nonlinear effects of soil moisture on pollinator visitation, largely mediated through changes in corolla size and floral display size.
(Glenny *et al.* 2018)	Flower number, flower size, VOC quantity, VOC composition	95% bees (36 species), 5% flies (N=408 individuals)		Pollinator visitation rate per plant was 52% lower to drought-treated plants compared to control plants only for *Potentilla recta*.
				For 3 other species (*Campanula rotundifolia*, *Heterotheca villosa*, *Phacelia hastata*), no effect (less signals/rewards modified compared to *P. recta*).

(Descamps *et al.* 2018)	Flower number, flower size, nectar volume, nectar sucrose quantity	33 bumblebees (N visits= 1148 flowers)	⊛	Water stress decreased the number of visited flowers at 21°C and increased it at 27°C.

3.2.1. Smaller plants with fewer flowers

Floral stem height contributes to floral attractiveness since higher flowers are more visible and accessible than lower flowers (Ouvrard *et al.* 2018). Plant height is reduced under water stress, in most cases by 10–20% (Mal and Lovett-Doust 2005; Kahl *et al.* 2019), but 2 studies indicate reductions of up to 50% (Al-Ghzawi *et al.* 2009; Qaderi *et al.* 2012, see Table 3). In 4 out of 16 studies, water stress had no effect on plant height (Table 3). However, stress was applied in these cases at the time of flower initiation, after vegetative development was complete. When stress was applied earlier, plant height decreased in both controlled and field conditions. Thus, the effects of drought on stem height depend on the stage of development in which water stress occurs.

Plant height differed between natural populations along a rainfall gradient (Lázaro-Nogal *et al.* 2015; Lambrecht *et al.* 2017). For example, flowering stems of *Senna candolleana* (Fabaceae) were 150 cm high in dry sites (approx. 100 mm rainfall per year) and 250 cm in mesic sites (approx. 400 mm rainfall, Lázaro-Nogal *et al.* 2015). This size decrease along a rainfall gradient can be due to phenotypic plasticity and/or to genetic adaptation resulting from natural selection (Lambrecht *et al.* 2017). Such reductions in height under drought could be explained by changes in resource allocation. Reductions in shoot/root ratios can lead to an overall reduction in growth of aerial vegetative and reproductive tissues (Poorter *et al.* 2012 ; Eziz *et al.* 2017). Mechanistically, water stress may also be associated with reduced cell elongation, which explains some of the reduced stem height (Prasad *et al.* 2008 ; Gray and Brady 2016).

In addition to being smaller, plants under drought usually produce fewer flowers. Flower number and density is considered as signal for pollinator attractiveness (Schiestl and Johnson 2013; Fowler *et al.* 2016). Drought-related reductions in flowers ranged from 30–50% in the studies we reviewed (Tab. 3). In *Arabidopsis thaliana*, when the water stress was applied over several weeks, an initial slowdown or stop in the rate of new flower formation could be observed, followed by a partial recovery in flower production (Ma *et al.* 2014). For almost 75% of the studied species, the total number of flowers produced under drought remained lower than under well-watered conditions (but see Gray and Brady 2016). Depending on the species, drought also led to high percentages (up to 50%) of flower abortion (Fang *et al.* 2010; Guo *et al.* 2013; Descamps *et al.* 2018).

Abortion of flower buds or of flowers reduces the maintenance costs and water loss associated with flowers (Galen *et al.* 1999; Lambrecht and Dawson 2007). In *Onobrychis viciifolia*, reducing the number of flowers per plant allowed plants to maintain similar per-flower nectar production under drought than under control condition (Phillips *et al.* 2018). Four studies did not report any changes in the number of flowers associated with drought (Tab. 3; Prieto *et al.* 2008; del Cacho *et al.* 2013; Gallagher and Campbell 2017; Phillips *et al.* 2018). These studies were performed under uncontrolled (field) conditions, which may explain the lack of observed effects. For example, species growing in dry

calcareous grasslands could be more adapted to drought conditions than species from well-watered habitats such as wet meadows (Phillips *et al.* 2018). In another field study on the perennial *Mertensia ciliata,* no difference in the number of flowers was observed between water-stressed and control plots (Gallagher and Campbell 2017). This result was explained as plants can use previously stored resources to restart spring growth even under drought (Gallagher and Campbell 2017). In this case, the effects of stress would only be visible after several years of drought. Finally, species-specific differences in flowering time and the water use strategies may also explain these divergent results (Prieto *et al.* 2008). To our knowledge, there are no long-term studies that track the effects of drought on floral traits. Such studies may be useful to better understand bee-pollinated species strategies facing drought.

3.2.2. Flower size reduction

Most studies reported a reduction in flower size from 5% to 60% due to drought (Table 3). Flower size reduction was often assumed to be related to water stress. However, flower size acts as a visual cue for pollinators; decreasing the size has potential consequences on pollinator visitation rates and on the type of pollinators visiting the flower (bees, syrphids, etc. ; Stanton and Preston 1988 ; Gómez *et al.* 2008, 2020). Galen (1999) highlighted that, under drought, corollas had smaller petals with smaller and more densely packed cells, due to a reduction in cell elongation, than unstressed plants. Smaller corollas need less water to maintain turgor in their cells, improving plant water status. Water loss from evaporation and transpiration is also reduced in smaller corollas compared to larger corollas (Galen *et al.* 1999; Lambrecht and Dawson 2007; Teixido and Valladares 2014).

The evolutionary mechanisms underlying reduced flower size in response to water stress are still under debate for many species. Smaller corollas may be the result of selection in dry habitats (Herrera 2005; Lambrecht and Dawson 2007; Lambrecht 2013) or a product of floral phenotypic plasticity (Carroll *et al.* 2001; Mal and Lovett-Doust 2005; Caruso 2006; Edwards *et al.* 2012). In dry environments, pollinator-mediated selection has been proposed as the driver for adaptive floral size (Miller 1981). In this case, floral traits are correlated with the flower visitor type. Herrera (2005), for example, observed that both the proportion of large bees and the size of *Rosmarius* flowers increased from the coast to the mountains in the Iberian Peninsula along a precipitation gradient. Other authors suggest that reduced flower size is an example of adaptive phenotypic plasticity (Carroll *et al.* 2001; Mal and Lovett-Doust 2005; Caruso 2006; Edwards *et al.* 2012). Selection can of course occur simultaneously from both pollinators and abiotic factors (Caruso *et al.* 2019).

Stamens and carpels may also be shortened by drought (Mal and Lovett-Doust 2005; Edwards *et al.* 2012; Su *et al.* 2013; Lambrecht *et al.* 2017). Drought stress can cause flower deformity (e.g., decreasing petal number) and affect flower morphogenesis (Smith and Zhao 2016). We hypothesize that these modifications to floral organs may have

consequences for fertilization and pollination by insects. For example, a reduced distance between anther and stigma favors self-pollination (Mal and Lovett-Doust 2005).

3.2.3. Flower color preserved

Although flower size was widely investigated, only 3 studies measured the impact of water availability on flower color (Tab 3). Pigments in the flowers are visual signals for attraction of pollinators, and are under selective pressure (Glover 2011 ; Borghi *et al.* 2019). No effects of drought were detected for flower pigmentation in any of the studies, either in controlled conditions for *Pelargonium hortorum* (Sánchez-Blanco *et al.* 2009) or in the field for *Silene littorea* (del Valle *et al.* 2015). Brunet and Van Etten (2019) studied three (chroma, hue and reflectivity) color parameters on *Aquilegia coerulea*, but only the reflectivity (total reflected light between 400 and 700 nm) increased under drought. Although leaves frequently accumulate phenolic compounds that can change their color during stress, the color of the flowers tend to be preserved under stress since flower color depends on other pigments such as anthocyanins or carotenoids (van der Kooi et al. 2019). In addition to pigmentation, all the optical properties of flowers (chromatic and achromatic contrast, saturation and brightness, gloss, fluorescence, polarization and iridescence) are involved in visual floral signaling (van der Kooi *et al.* 2019) and responses of these properties to abiotic stress remain unexplored until now.

3.2.4. Olfactory signal modification

Pollinators may use floral scent constituted by volatile organic compounds (VOCs) emitted by flowers to detect the presence of rewards (Chittka and Raine 2006; Wright and Schiestl 2009). More than 1700 VOCs have been detected in flowers (Knudsen *et al.* 2006). Flower scent may act as long-range attractants compared to visual cues which act as short-range attractants (Raguso 2008; Hirota *et al.* 2012; Junker and Parachnowitsch 2015). The emission of these molecules depends on the rate of their biosynthesis and on their volatility, solubility, and diffusibility (Borghi *et al.* 2019). Abiotic stress generally increases emission of VOCs (reviewed by Peñuelas and Staudt 2010, and Farré-Armengol *et al.,* 2013). A small number of studies had investigated changes in floral scent due to abiotic factors. Only three studies, performed on herbaceous plants from North America, explored how soil water content influences VOCs (Tab. 3). Burkle and Runyon (2016) and Glenny *et al.* (2018) worked on the same group of species (*Campanula rotundifolia*, *Heterotheca villosa*, *Phacelia hastata*, *Potentilla recta*) and observed that water stress increased the total amount of VOCs produced as well as modified their composition. This was mainly observed for two out of the four tested, *Campanula rotundifolia* and *Potentilla recta*. A shift in the composition of floral volatiles of water-stressed *Ipomopsis aggregata* is observed (Campbell *et al.* 2019). The floral bouquet of stressed plants contained more monoterpenes α-pinene and (*E*)-β-ocimene and sesquiterpene (*E,E*)-α-farnesene and less 1,3-octadiene and the benzenoid benzyl alcohol than non-stressed plants. VOCs are produced through different pathways that could response differentially to drought (Campbell *et al.* 2019). This study highlighted the non-linear response of floral volatile

composition to soil water content (Campbell *et al.* 2019). Floral VOC composition seems to be more determinant for pollinator attraction than the VOC total quantity (Raguso *et al.* 2008, Burkle and Runyon 2017, Glenny *et al.* 2018). Studies about the effect of drought on flower scent are still limited.

3.3. Floral rewards are declining, decreasing food supply for pollinators

3.3.1. Nectar volume decreased while nectar concentration and composition were less affected

The two principal components of nectar, water and sugars, are reduced in response to drought (Lemoine *et al.* 2013; Lamaoui *et al.* 2018). Drought was generally associated with lower volumes of nectar compared with well-watered plants in the studies we examined (Tab. 3). Reduced nectar volume could be explained by a shortage in water supply (Wyatt *et al.* 1992). However, drought did not always result in reduced nectar volume. For example, Phillips *et al.* (2018) did not observe any reduction of nectar volume per flower for *Lathyrus pratensis*, *Onobrychis viciifolia*, and *Prunella vulgaris* due to drought and attributed this to the plants' conservative growth strategy and overall resistance to drought. Surprisingly, Suni *et al.* (2020) observed an increase of nectar volume under water stress for some populations of *Phlox drummondii*. They investigated nectar production at several time points in plants across differing precipitation regimes and showed that plants had different nectar production strategies (Suni *et al.* 2020). Interestingly, plants from drier environments produced more nectar with higher sugar content as a result of water-stressed conditions. By contrast, plants from wetter environments produced less nectar with lower sugar content under water stress (Suni *et al.* 2020).

The production of nectar under drought may also depend on the reproductive strategy of a species. For example, Phillips *et al.* (2018) observed nectarless flowers in response to water stress for *L. pratensis* and *P. vulgaris,* which they attributed to these species' capacity for self-pollination. By contrast, *O. viciifolia*, which is an obligate cross-pollinated species that needs to attract pollinators with nectar, did not exhibit nectar reductions. The impact of water stress thus depends on the plant species and may be linked with its breeding system.

The effects of drought on the sugar concentration of nectar and sugar quantity per flower are less obvious than effects on nectar volume. Eight studies reported no significant change in sugar concentration in response to drought (Table 3) although one study found an increase of sugar concentration in nectar of *Echium plantagineum* (Descamps *et al.* 2020). When considering total nectar sugar quantity per flower (concentration x volume) there is no consensus in the literature about the impact of water stress. Total sugar quantity in nectar per flower may decrease, increase or remain stable in response to water stress depending on the study (Table 3). Sugar per flower probably depends on photosynthesis, but also plant species, population and experimental design. One study recently examined the effects of drought on nectar sucrose composition and found no effect (Clearwater *et*

al. 2018). However, studies investigating the effect of water stress on sugar composition of nectar are very rare. The associations between nectar quality and abiotic stress are obviously complex and further investigation is required to disentangle drought effects from other factors.

3.3.2. Failures of pollen maturation under water stress

Pollen quantity is determined early in flower development, during microsporogenesis (Goldberg *et al.* 1993). Drought applied at the beginning of blooming did not seem to affect pollen grain number in the study by Descamps *et al.* (2018). However, pollen quantity can be reduced if drought is applied earlier. Waser and Price (2016) showed that pollen production quickly reached an asymptote regarding the availability of water in natural conditions.

Anther and pollen development are the reproductive stages most sensitive to water stress (Smith and Zhao 2016; Yu *et al.* 2019). Detailed studies showed that water stress negatively impacts metabolic transport mechanisms of sucrose which reduces the stored starch or lipid in the pollen grain (Borghi *et al.* 2019). Pollen viability, which may vary from a few minutes to several days according plant species and environmental conditions, may be affected by drought (reviewed by Smith and Zhao 2016; Pacini and Dolferus 2019; Bellusci et al. 2010; Borghi et al. 2019). Disruption of pollen development due to drought has been mainly studied in Poaceae species and in *Arabidopsis thaliana* (Koonjul *et al.* 2005; Li *et al.* 2015). Studies with other herbaceous species have also found a decrease in pollen viability under drought (Turner 1993; Al-Ghzawi *et al.* 2009; Fang *et al.* 2010; Su *et al.* 2013; Descamps *et al.* 2018, Table 3). Only 1 out of the 10 studies we found examining pollen viability did not show effects of drought (Guo *et al.* 2013). Although the impact of water stress on pollen viability has been extensively investigated, its effect on pollen composition as nutritional resource for pollinators remains largely unknown. Bees forage pollen as a source of polypeptides, amino acids and sterols. Reduction in viability could be linked to lower protein contents (Muth *et al.* 2016), but this hypothesis needs verification. The effects of drought on chemical composition of pollen also deserve further investigation.

4. Consequences for plants and pollinators under drought

4.1. Complex responses for pollinator visitation rate

As shown in Fig. 9, the rate of pollinator visitation depends on visual and olfactory signals as well as floral rewards (Nicolson 2011; Schiestl and Johnson 2013; Fowler *et al.* 2016 ; Barragán-Fonseca *et al.* 2020). Changing these cues and rewards can induce a change in pollinator behavior. For example, pollinator visitation rate is affected by variation in flower size (Gómez *et al.* 2008) or by a modification of nectar or pollen composition (Somme *et al.* 2014). Floral display, which depends on floral stem height, on number of

flowers and their size, is crucial for attracting pollinators (Schiestl and Johnson 2013; Barragán-Fonseca *et al.* 2020). This parameter is clearly negatively affected by drought as stressed plants can be smaller, with fewer flowers, and flowers with a smaller size compared to unstressed plants. Several studies that tested the impact of altered cues on pollinator behavior have found variable results for pollinator visitation rates (Tab. 4). In each of these studies, a subset of signals have been modified and it is unclear whether a single signal or combination of signals may be driving the response. For example, in the study of Glenny *et al.* (2018), VOCs increased under water stress but visual signals were greatly altered, suppressing visitation rates. The effect of water stress on pollinator visitation rate is non-linear and complex as shown by Gallagher and Campbell (2017) and Descamps *et al.* (2018). Further behavioral studies will be required to investigate the relative importance of the different floral signal modifications due to drought for insect attractiveness. In order to link changes in visitation rates due to drought with an effect on plant reproduction, studies should systematically take into account parameters such as the amount of pollen deposited on stigmas and/or fruit and seed set but it is not always the case.

Altered floral signals or rewards may attract different pollinator taxa. For instance, there is a well-known correlation between insect proboscis length and corolla depth. Long-tongued insects are abundant pollinators, sometimes specialized or oligolectic, on deep corolla tube flowers, while short-tongued pollinators remain polylectic on short tube or open corolla flowers (Borrell 2005; Miller-Struttmann *et al.* 2015; Klumpers *et al.* 2019; Gérard *et al.* 2020). Changes in pollinators may in turn affect pollen deposition effectiveness since for example smaller pollinators have a lower single-visit pollen deposition rates compared to larger pollinators (Solís-Montero and Vallejo-Marín 2017).

4.2. Plant reproductive success negatively affected

A wide variety of plant structures associated with reproductive success may be affected by water stress, including pollen viability, pollen tube growth, stigma receptivity, ovule number, ovule fertilization and seed development (Turner 1993; Frazee and Marquis 1994; Guilioni *et al.* 2003; Fang *et al.* 2010; Su *et al.* 2013; Kay and Picklum 2013; Sehgal *et al.* 2019). Drought decreases pollen viability, but can also impair pollen tube growth (Fang *et al.* 2010). Borrell (2005) observed a 30% reduction in pollen tubes reaching ovules under water stress resulting in decreased fertilization. Although carpels appear to be generally less sensitive to drought than stamens (Su *et al.* 2013; Teixido and Valladares 2019), drought could negatively affect the stigma receptivity or ovule number (Turner 1993; Frazee and Marquis 1994; Su *et al.* 2013; Kay and Picklum 2013). Several studies have reported the abortion of ovaries under drought stress (Alqudah *et al.* 2011; Smith and Zhao 2016). In *Lens culinari*, even though pollen tubes reached the ovules and fertilization took place, post-fertilization abortion impaired seed development (Sehgal *et al.* 2019). All these factors may contribute to decreased seed and fruit sets. The reduction of fruit and seed sets under water stress is well established in the literature (Turner 1993; Galen 2000; Boutraa and Sanders 2001; Guilioni *et al.* 2003; Al-Ghzawi *et al.* 2009; El

Balla *et al.* 2013; del Cacho *et al.* 2013; Ma *et al.* 2014; Sivakumar and Srividhya 2016; Mantel and Sweigart 2019; Sehgal *et al.* 2019) and mostly follows linear response to stress (Gallagher and Campbell 2017).

4.3. Food supply for pollinators, quantity, and probably quality reduced under drought

Declines in flower number and floral rewards due to water stress may reduce the food supply for pollinators and thus affect pollinator populations (Miller-Struttmann *et al.* 2015; Baude *et al.* 2016). Flower life span may decrease under water stress (Primack 1985) and the time-window for floral rewards may shorten. Bees, for example, can experience nutritional shortage because of reduced floral reward quantity or quality (Vaudo *et al.* 2015). Carvell *et al.* (2017) showed that the floral resource availability is a major limiting factor for bumblebee survival. Though there are few studies on the nutritional quality of floral rewards resulting from abiotic stress, we hypothesize that quality decreases overall under drought. For example, low-viability pollen and nectar with a low sugar content is likely to have a lower nutritional quality for insects. Decreases in nutritional benefits increase the marginal visiting costs for insects, since they have to visit more flowers to collect a same quantity of nutrients. Lastly, decreasing floral resource quantity could also increase the resource competition between wild and managed bees (Thomson 2016).
Despite these predictions, there is a need for more data on the effects of drought on pollinator food supply. Among insect pollinators, bees depend exclusively on floral resources (nectar and pollen) for their food. The nutritional quality (e.g., nectar sugar composition, amino acid content, pollen protein content) is crucial for bee survival, as evident in experimental studies where lower quality of floral resources have been associated with decreasing bee longevity or reproductive capacity (Hoover *et al.* 2012; Vaudo *et al.* 2015; Ziska *et al.* 2016). In nectar, the sugar source for pollinators, differences in sugar content under drought have been studied. Investigations about modifications due to drought in pollen composition, the main source of proteins and lipids for pollinators, are still needed.

5. Conclusion: What's next?

This synthesis focused on the effects of drought on floral attractiveness and floral rewards for insect pollinators. We suggest that the modifications in floral signals and rewards in response to drought could lead to negative consequences for both plants and pollinators in terms of reproductive success for plants and food provisioning for insects. We focused our analyses on plant individual scale ; however, these modifications have also consequences at the population level. Even if no particular differences were observed at the individual level between wild and crop species, the implications at the population level differ. For crop species, at the field scale, each individual flowers are surrounded by thousands of congeners that can decrease its attractiveness to pollinators (named 'dilution effect') and potentially decrease its reproductive success. However, each

individual of crop species may be less influenced by the mean level of attractiveness per individual compared to each individual of wild species which compete locally with other species for pollinators. This can lead to different effects in terms of reproductive success. Furthermore, for wild species, the effects of drought in the field may also differ between populations of the same species, as it was shown by Caruso (2006) on *Lobelia siphilitica* and by Suni *et al.* (2020) on *Phlox drummondii*. The population effects and implications on reproductive success should not be neglected in further studies on the effect of droughts on crop or wild species.

Drought-induced modifications may generate negative morphological or behavioral mismatches between plants and their pollinators. Such mismatches, recently reviewed by Gérard *et al.* (2020) in the context of global warming, may also occur due to drought through the same mechanisms, at individual level. These mismatches have the potential to disrupt plant–pollinator interactions and can lead to change the structure and abundance of insect-pollinated species and pollinators (Biesmeijer *et al.* 2006; Rafferty 2017; Walter 2018; Gérard *et al.* 2020). Moreover, the combined effects of drought and global warming may compound deleterious effects on plant–pollinator interactions.

Future research should seek to understand how drought affects morphological and behavioral mismatches between plants and pollinators. There is a lack of information about the impact of drought on important floral signals such as color and scent, as well as the nutritional qualities of floral rewards, which are crucial for insect health and development. More studies are necessary, particularly, in highly attractive entomophilous species, such as those belonging to the Brassicaceae, Lamiaceae and Rosaceae families, due to the high quantities and high nutritional qualities of their floral resources. Finally, the majority of the studies discussed in this paper were performed under controlled conditions, which may be unrealistic approximations of field conditions. Following Phillips et al. (2018), it is crucial to observe the effects of stressors on plant–pollinator interaction in a variety of habitats to successfully predict the consequence of drought, which will likely be habitat-dependent. As climate modelling predict in the coming years that the occurrence of spring and summer droughts for temperate regions will increase, it would also be necessary to measure the effect of repeated droughts on wild herbaceous species. Future meta-analyses about drought effects at individual and population levels require a larger set of observations and experiments performed under similar and comparable conditions. Large sets of data will allow us to model and predict future evolution in plant-pollinator interactions in the context of global and climatic changes. Such data will help inform a sustainable future for the plant–pollinator systems crucial for our society.

Acknowledgements
We thank Plant Editors (K. Farquharson, J. Mach, N. Hofmann) for language improvement and the three anonymous reviewers for their valuable comments on the first version of the manuscript. This work is a part of a Ph.D. thesis (C. Descamps) and

was published with funding from "Fondation universitaire de Belgique". There is no conflict of interest.

6. Bibliography

Aizen MA, Aguiar S, Biesmeijer JC, *et al.* 2019. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global Change Biology* **25**: 3516–3527.

Al-Ghzawi AA-M, Zaitoun S, Gosheh H, Alqudah A. 2009. Impacts of drought on pollination of *Trigonella moabitica* (Fabaceae) via bee visitations. *Archives of Agronomy and Soil Science* **55**: 683–692.

Alqudah AM, Samarah NH, Mullen RE. 2011. Drought stress effect on crop pollination, seed set, yield and quality In: Lichtfouse E, ed. Sustainable Agriculture Reviews. *Alternative Farming Systems, Biotechnology, Drought Stress and Ecological Fertilisation*. Springer Netherlands, 193–213.

Arathi HS, Rasch A, Cox C, Kelly JK. 2002. Autogamy and floral longevity in *Mimulus guttatus*. *International Journal of Plant Sciences* **163**: 567–573.

Barragán-Fonseca KY, Loon JJA van, Dicke M, Lucas-Barbosa D. 2020. Use of visual and olfactory cues of flowers of two brassicaceous species by insect pollinators. *Ecological Entomology* **45**: 45–55.

Bartomeus I, Ascher JS, Wagner D, *et al.* 2011. Climate-associated phenological advances in bee pollinators and bee-pollinated plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 20645–20649.

Baude M, Kunin WE, Boatman ND, *et al.* 2016. Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature* **530**: 85.

Bellusci F, Musacchio A, Stabile R, Pellegrino G. 2010. Differences in pollen viability in relation to different deceptive pollination strategies in Mediterranean orchids. *Annals of Botany* **106**: 769–774.

Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, *et al.* 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**: 351–354.

Borghi M, Perez de Souza L, Yoshida T, Fernie AR. 2019. Flowers and climate change: a metabolic perspective. *New Phytologist* **224**: 1425–1441.

Borrell BJ. 2005. Long tongues and loose niches: evolution of *Euglossine* bees and their nectar flowers. *Biotropica* **37**: 664–669.

Boutraa T, Sanders FE. 2001. Influence of water stress on grain yield and vegetative growth of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **187**: 251–257.

Brown MJF, Dicks LV, Paxton RJ, *et al.* 2016. A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination. *PeerJ* **4**: e2249.

Brunet J, Van Etten ML. 2019. The response of floral traits associated with pollinator attraction to environmental changes expected under anthropogenic climate change in high-altitude habitats. *International Journal of Plant Sciences* **180**: 954–964.

Burkle LA, Runyon JB. 2016. Drought and leaf herbivory influence floral volatiles and

pollinator attraction. *Global Change Biology* **22**: 1644–1654.
Burkle LA, Runyon JB. **2017**. The smell of environmental change: Using floral scent to explain shifts in pollinator attraction. *Applications in Plant Sciences* **5**.
Byers DL. **2017**. Studying plant–pollinator interactions in a changing climate: a review of approaches. *Applications in Plant Sciences* **5**: 1700012.
del Cacho M, Peñuelas J, Lloret F. **2013**. Reproductive output in Mediterranean shrubs under climate change experimentally induced by drought and warming. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **15**: 319–327.
Campbell DR, Sosenski P, Raguso RA. **2019**. Phenotypic plasticity of floral volatiles in response to increasing drought stress. *Annals of Botany* **123**: 601–610.
Cane JH. **2016**. Adult pollen diet essential for egg maturation by a solitary *Osmia* bee. *Journal of Insect Physiology* **95**: 105–109.
Carroll AB, Pallardy SG, Galen C. **2001**. Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **88**: 438–446.
Caruso CM. **2006**. Plasticity of inflorescence traits in *Lobelia siphilitica* (Lobeliaceae) in response to soil water availability. *American Journal of Botany* **93**: 531–538.
Caruso CM, Eisen KE, Martin RA, Sletvold N. **2019**. A meta-analysis of the agents of selection on floral traits. *Evolution* **73**: 4–14.
Carvell C, Bourke AFG, Dreier S, *et al.* 2017. Bumblebee family lineage survival is enhanced in high-quality landscapes. *Nature* **543**: 547–549.
Chittka L, Gumbert A, Kunze J. **1997**. Foraging dynamics of bumble bees: correlates of movements within and between plant species. *Behavioral Ecology* **8**: 239–249.
Chittka L, Raine NE. **2006**. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 428–435.
Clearwater MJ, Revell M, Noe S, Manley-Harris M. **2018**. Influence of genotype, floral stage, and water stress on floral nectar yield and composition of mānuka (*Leptospermum scoparium*). *Annals of Botany* **121**: 501–512.
Cnaani J, Thomson JD, Papaj DR. **2006**. Flower choice and learning in foraging bumblebees: effects of variation in nectar volume and concentration. *Ethology* **112**: 278–285.
Cohen JM, Lajeunesse MJ, Rohr JR. 2018. A global synthesis of animal phenological responses to climate change. *Nature Climate Change* **8**: 224–228.
Cook SM, Awmack CS, Murray DA, Williams IH. **2003**. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* **28**: 622–627.
Crausbay SD, Ramirez AR, Carter SL, *et al.* 2017. Defining Ecological Drought for the Twenty-First Century. *Bulletin of the American Meteorological Society* **98**: 2543–2550.
Dai A. **2013**. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change* **3**: 52–58.
Delle-Vedove R, Schatz B, Dufay M. **2017**. Understanding intraspecific variation of floral scent in light of evolutionary ecology. *Annals of Botany* **120**: 1–20.
Descamps C, Marée S, Hugon S, Quinet M, Jacquemart A-L. **2020**. Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated

congeners (*Echium*, Boraginaceae). *Ecology and Evolution*.
Descamps C, Quinet M, Baijot A, Jacquemart A-L. **2018**. Temperature and water stress affect plant–pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecology and Evolution* **8**: 3443–3456.
Dreisig H. **2012**. How long to stay on a plant: the response of bumblebees to encountered nectar levels. *Arthropod-Plant Interactions* **6**: 315–325.
Edwards CE, Ewers BE, McClung CR, Lou P, Weinig C. **2012**. Quantitative variation in water-use efficiency across water regimes and its relationship with circadian, vegetative, reproductive, and leaf gas-exchange traits. *Molecular Plant* **5**: 653–668.
EEA (European Enronment Agency). **2017**. *Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2016: An indicator-based report*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
El Balla MMA, Hamid AA, Abdelmageed AHA. **2013**. Effects of time of water stress on flowering, seed yield and seed quality of common onion (*Allium cepa* L.) under the arid tropical conditions of Sudan. *Agricultural Water Management* **121**: 149–157.
Eziz A, Yan Z, Tian D, Han W, Tang Z, Fang J. **2017**. Drought effect on plant biomass allocation: A meta-analysis. *Ecology and Evolution* **7**: 11002–11010.
Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, *et al.* 2017. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science* **8**.
Fang X, Turner NC, Yan G, Li F, Siddique KHM. **2010**. Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. *Journal of Experimental Botany* **61**: 335–345.
Farré-Armengol G, Filella I, Llusia J, Peñuelas J. **2013**. Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **15**: 56–67.
Fowler RE, Rotheray EL, Goulson D. **2016**. Floral abundance and resource quality influence pollinator choice. *Insect Conservation and Diversity* **9**: 481–494.
Forrest JRK. 2015. Plant–pollinator interactions and phenological change: what can we learn about climate impacts from experiments and observations? *Oikos* **124**: 4–13**.**
Frazee JE, Marquis RJ. **1994**. Environmental contribution to floral trait variation in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae: Caesalpinoideae). *American Journal of Botany* **81**: 206–215.
Galen C. **1999**. Why do flowers vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioScience* **49**: 631–640.
Galen C. **2000**. High and dry: drought stress, sex-allocation trade-offs, and selection on flower size in the alpine wildflower *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *The American Naturalist* **156**: 72–83.
Galen C, Sherry RA, Carroll AB. **1999**. Are flowers physiological sinks or faucets? Costs and correlates of water use by flowers of *Polemonium viscosum*. *Oecologia* **118**: 461–470.
Gallagher MK, Campbell DR. **2017**. Shifts in water availability mediate plant–pollinator interactions. *New Phytologist* **215**: 792–802.
Gérard M, Vanderplanck M, Wood T, Michez D. **2020**. Global warming and plant–pollinator mismatches. *Emerging Topics in Life Sciences*.
Ghazoul J. **2005**. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in*

Ecology & Evolution **20**: 367–373.
Glenny WR, Runyon JB, Burkle LA. **2018**. Drought and increased CO_2 alter floral visual and olfactory traits with context-dependent effects on pollinator visitation. *New Phytologist* **220**: 785–798.
Glover BJ. **2011**. Pollinator attraction: the importance of looking good and smelling nice. *Current Biology* **21**: R307–R309.
Goldberg RB, Beals TP, Sanders PM. **1993**. Anther development: basic principles and practical applications. *The Plant Cell* **5**: 1217–1229.
Gómez JM, Bosch J, Perfectti F, Fernández J d, Abdelaziz M, Camacho J p. m. **2008**. Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 2241–2249.
Gómez JM, Perfectti F, Armas C, *et al.* 2020. Within-individual phenotypic plasticity in flowers fosters pollination niche shift. *Nature Communications* **11**: 4019.
Gonzáles WL, Suárez LH, Gianoli E. **2016**. Genetic variation in the reduction of attractive floral traits of an annual tarweed in response to drought and apical damage. *Journal of Plant Ecology* **9**: 629–635.
Gray SB, Brady SM. **2016**. Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology* **419**: 64–77.
Guilioni L, Wéry J, Lecoeur J. **2003**. High temperature and water deficit may reduce seed number in field pea purely by decreasing plant growth rate. *Functional Plant Biology,* **30**: 1151–1164.
Guo YM, Chen S, Nelson MN, Cowling W, Turner NC. **2013**. Delayed water loss and temperature rise in floral buds compared with leaves of *Brassica rapa* subjected to a transient water stress during reproductive development. *Functional Plant Biology* **40**: 690–699.
Halpern SL, Adler LS, Wink M. **2010**. Leaf herbivory and drought stress affect floral attractive and defensive traits in *Nicotiana quadrivalvis*. *Oecologia* **163**: 961–971.
Herrera J. **2005**. Flower size variation in *Rosmarinus officinalis*: Individuals, populations and habitats. *Annals of Botany* **95**: 431–437.
Hirota SK, Nitta K, Kim Y, *et al.* 2012. Relative role of flower color and scent on pollinator attraction: experimental tests using F1 and F2 hybrids of Daylily and Nightlily. *PLOS ONE* **7**: e39010.
Hoover SE, Ladley JJ, Shchepetkina AA, Tisch M, Gieseg SP, Tylianakis JM. **2012**. Warming, CO2, and nitrogen deposition interactively affect a plant-pollinator mutualism. *Ecology letters* **15**: 227–234.
IPBES. 2016. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, and H. T. Ngo (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 552 pages.
IPCC. **2014**. *Climate change 2014: synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva, Switzerland.
Jorgensen R, Arathi HS. **2013**. Floral longevity and autonomous selfing are altered by

pollination and water availability in *Collinsia heterophylla*. *Annals of Botany* **112**: 821–828.
Junker RR, Parachnowitsch AL. **2015**. Working towards a holistic view on flower traits-how floral scents mediate plant-animal interactions in concert with other floral characters. *Journal of the Indian Institute of Science* **95**: 43–67.
Kahl SM, Lenhard M, Joshi J. **2019**. Compensatory mechanisms to climate change in the widely distributed species *Silene vulgaris*. *Journal of Ecology* **107**: 1918–1930.
Kay KM, Picklum DA. **2013**. Drought alters the expression of mating system traits in two species of *Clarkia*. *Evolutionary Ecology* **27**: 899–910.
Klein A-M, Vaissiere BE, Cane JH, *et al.* 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 303–313.
Klumpers SGT, Stang M, Klinkhamer PGL. **2019**. Foraging efficiency and size matching in a plant–pollinator community: the importance of sugar content and tongue length. *Ecology Letters* **22**: 469–479.
Knauer AC, Schiestl FP. **2015**. Bees use honest floral signals as indicators of reward when visiting flowers. *Ecology Letters* **18**: 135–143.
Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, St\aahl B. **2006**. Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review* **72**: 1.
van der Kooi CJ, Dyer AG, Kevan PG, Lunau K. **2019**. Functional significance of the optical properties of flowers for visual signalling. *Annals of Botany* **123**: 263–276.
Koonjul PK, Minhas JS, Nunes C, Sheoran IS, Saini HS. **2005**. Selective transcriptional down-regulation of anther invertases precedes the failure of pollen development in water-stressed wheat. *Journal of Experimental Botany* **56**: 179–190.
Lamaoui M, Jemo M, Datla R, Bekkaoui F. **2018**. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry* **6**.
Lambrecht SC. **2013**. Floral water costs and size variation in the highly selfing *Leptosiphon bicolor* (Polemoniaceae). *International Journal of Plant Sciences* **174**: 74–84.
Lambrecht SC, Dawson TE. **2007**. Correlated variation of floral and leaf traits along a moisture availability gradient. *Oecologia* **151**: 574–583.
Lambrecht SC, Morrow A, Hussey R. **2017**. Variation in and adaptive plasticity of flower size and drought-coping traits. *Plant Ecology* **218**: 647–660.
Lázaro-Nogal A, Matesanz S, Godoy A, Pérez-Trautman F, Gianoli E, Valladares F. **2015**. Environmental heterogeneity leads to higher plasticity in dry-edge populations of a semi-arid Chilean shrub: insights into climate change responses. *Journal of Ecology* **103**: 338–350.
Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, *et al.* 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**.
Li X, Lawas LMF, Malo R, *et al.* 2015. Metabolic and transcriptomic signatures of rice floral organs reveal sugar starvation as a factor in reproductive failure under heat and drought stress. *Plant, Cell & Environment* **38**: 2171–2192.
Ma X, Sukiran N, Ma H, Su Z. **2014**. Moderate drought causes dramatic floral transcriptomic reprogramming to ensure successful reproductive development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **14**: 164.
Mal TK, Lovett-Doust J. **2005**. Phenotypic plasticity in vegetative and reproductive traits in an invasive weed, *Lythrum salicaria* (Lythraceae), in response to soil moisture.

American Journal of Botany **92**: 819–825.
Mantel SJ, Sweigart AL. 2019. Divergence in drought-response traits between sympatric species of *Mimulus*. *Ecology and Evolution* **9**: 10291–10304.
Miller RB. 1981. Hawkmoths and the geographic patterns of floral variation in *Aquilegia Caerulea*. *Evolution* **35**: 763–774.
Miller-Struttmann NE, Geib JC, Franklin JD, *et al.* 2015. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science* **349**: 1541–1544.
Muth F, Francis JS, Leonard AS. 2016. Bees use the taste of pollen to determine which flowers to visit. *Biology Letters* **12**: 20160356.
Nicholson CC, Egan PA. 2020. Natural hazard threats to pollinators and pollination. *Global Change Biology* **26**: 380–391.
Nicolson SW. 2011. Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology* **46**: 197–204.
Nicolson, Susan W. 2007. Nectar consumers In: *Nectaries and Nectar*. Springer Netherlands, 289–342.
Ogilvie JE, Griffin SR, Gezon ZJ, *et al.* 2017. Interannual bumble bee abundance is driven by indirect climate effects on floral resource phenology. *Ecology Letters* **20**: 1507–1515.
Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* **120**: 321–326.
Opedal ØH, Listemann J, Albertsen E, Armbruster WS, Pélabon C. 2016. Multiple effects of drought on pollination and mating-system traits in *Dalechampia scandens*. *International Journal of Plant Sciences* **177**: 682–693.
Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* **5**.
Ouvrard P, Transon J, Jacquemart A-L. 2018. Flower-strip agri-environment schemes provide diverse and valuable summer flower resources for pollinating insects. *Biodiversity and Conservation* **27**: 2193–2216.
Pacini E, Dolferus R. 2019. Pollen Developmental Arrest: Maintaining Pollen Fertility in a World With a Changing Climate. *Frontiers in Plant Science* **10**.
Peñuelas J, Gordon C, Llorens L, *et al.* 2004. Nonintrusive field experiments show different plant responses to warming and drought among sites, seasons, and species in a North–South European gradient. *Ecosystems* **7**: 598–612.
Peñuelas J, Staudt M. 2010. BVOCs and global change. *Trends in Plant Science* **15**: 133–144.
Perring F, Farrell L. 1977. British red data books, vascular plants. Society for the Promotion of Nature Conservation, Lincoln, United Kingdom.
Phillips BB, Shaw RF, Holland MJ, *et al.* 2018. Drought reduces floral resources for pollinators. *Global Change Biology* **24**: 3226–3235.
Pinheiro C, Chaves MM. 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany* **62**: 869–882.
Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, Oleksyn J, Poot P, Mommer L. 2012. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* **193**: 30–50.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. **2010**. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 345–353.

Potts SG, Vulliamy B, Dafni A, Ne'eman G, Willmer P. **2003**. Linking bees and flowers: How do floral communities structure pollinator communities? *Ecology* **84**: 2628–2642.

Prasad PVV, Staggenborg SA, Ristic Z. **2008**. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of crops to limited water: understanding and modeling water stress effects on plant growth processes*: 301–355.

Prieto P, Peñuelas J, Ogaya R, Estiarte M. **2008**. Precipitation-dependent flowering of *Globularia alypum* and *Erica multiflora* in Mediterranean shrubland under experimental drought and warming, and its inter-annual variability. *Annals of Botany* **102**: 275–285.

Primack RB. **1985**. Longevity of Individual Flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 15–37.

Pyke GH, Thomson JD, Inouye DW, Miller TJ. **2016**. Effects of climate change on phenologies and distributions of bumble bees and the plants they visit. *Ecosphere* **7**: e01267.

Qaderi MM, Kurepin LV, Reid DM. **2012**. Effects of temperature and watering regime on growth, gas exchange and abscisic acid content of canola (*Brassica napus*) seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **75**: 107–113.

Quinet M, Descamps C, Coster Q, Lutts S, Jacquemart A-L. **2015**. Tolerance to water stress and shade in the invasive *Impatiens parviflora*. *International Journal of Plant Sciences* **176**: 848–858.

Rafferty NE. **2017**. Effects of global change on insect pollinators: multiple drivers lead to novel communities. *Current Opinion in Insect Science* **23**: 22–27.

Raguso RA. **2004**. Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. *Advances in insect chemical ecology*: 151–178.

Raguso RA. **2008**. Wake Up and Smell the Roses: The Ecology and Evolution of Floral Scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**: 549–569.

Ropars L, Affre L, Schurr L, *et al.* 2020. Land cover composition, local plant community composition and honeybee colony density affect wild bee species assemblages in a Mediterranean biodiversity hot-spot. *Acta Oecologica* **104**: 103546.

Sánchez-Blanco MJ, Álvarez S, Navarro A, Bañón S. **2009**. Changes in leaf water relations, gas exchange, growth and flowering quality in potted geranium plants irrigated with different water regimes. *Journal of Plant Physiology* **166**: 467–476.

Scaven VL, Rafferty NE. **2013**. Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Current zoology* **59**: 418–426.

Schiestl FP, Johnson SD. **2013**. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution* **28**: 307–315.

Sehgal A, Sita K, Bhandari K, *et al.* 2019. Influence of drought and heat stress, applied independently or in combination during seed development, on qualitative and quantitative aspects of seeds of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes, differing in

drought sensitivity. *Plant, Cell & Environment* **42**: 198–211.
Settele J, Bishop J, Potts SG. **2016**. Climate change impacts on pollination. *Nature Plants* **2**: 16092.
Sivakumar R, Srividhya S. **2016**. Impact of drought on flowering, yield and quality parameters in diverse genotypes of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Advances in Horticultural Science* **30**: 3-11–11.
Slette IJ, Post AK, Awad M, *et al.* 2019. How ecologists define drought, and why we should do better. *Global Change Biology* **25**: 3193–3200.
Smith AR, Zhao D. **2016**. Sterility caused by floral organ degeneration and abiotic stresses in *Arabidopsis* and cereal grains. *Frontiers in Plant Science* **7**.
Solís-Montero L, Vallejo-Marín M. **2017**. Does the morphological fit between flowers and pollinators affect pollen deposition? An experimental test in a buzz-pollinated species with anther dimorphism. *Ecology and Evolution* **7**: 2706–2715.
Somme L, Vanderplanck M, Michez D, *et al.* 2014. Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie* **46**: 92–106.
Spinoni J, Vogt JV, Naumann G, Barbosa P, Dosio A. **2018**. Will drought events become more frequent and severe in Europe? *International Journal of Climatology* **38**: 1718–1736.
Stanton ML, Preston RE. **1988**. Ecological consequences and phenotypic correlates of petal size variation in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **75**: 528–539.
Su Z, Ma X, Guo H, *et al.* 2013. Flower development under drought stress: Morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 3785–3807.
Suni SS, Ainsworth B, Hopkins R. **2020**. Local adaptation mediates floral responses to water limitation in an annual wildflower. *American Journal of Botany* **107**: 209–218.
Teixido AL, Valladares F. **2014**. Disproportionate carbon and water maintenance costs of large corollas in hot Mediterranean ecosystems. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **16**: 83–92.
Teixido AL, Valladares F. **2019**. Heat and drought determine flower female allocation in a hermaphroditic Mediterranean plant family. *Plant Biology* **21**: 1024–1030.
Thomson DM. **2016**. Local bumble bee decline linked to recovery of honey bees, drought effects on floral resources. *Ecology Letters* **19**: 1247–1255.
Turner LB. **1993**. The effect of water stress on floral characters, pollination and seed set in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **44**: 1155–1160.
del Valle JC, Buide ML, Casimiro-Soriguer I, Whittall JB, Narbona E. **2015**. On flavonoid accumulation in different plant parts: variation patterns among individuals and populations in the shore campion (*Silene littorea*). *Frontiers in Plant Science* **6**.
Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM. **2015**. Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science* **10**: 133–141.
Villarreal AG, Freeman CE. **1990**. Effects of temperature and water stress on some floral nectar characteristics in *Ipomopsis longiflora* (Polemoniaceae) under controlled conditions. *Botanical Gazette* **151**: 5–9.
Walter J. **2018**. Effects of changes in soil moisture and precipitation patterns on plant-

mediated biotic interactions in terrestrial ecosystems. *Plant Ecology* **219**: 1449–1462.
Walter J. **2020**. Dryness, wetness and temporary flooding reduce floral resources of plant communities with adverse consequences for pollinator attraction. *Journal of Ecology* **00**: 1–12.
Waser NM, Price MV. **2016**. Drought, pollen and nectar availability, and pollination success. *Ecology* **97**: 1400–1409.
Wright GA, Schiestl FP. **2009**. The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards. *Functional Ecology* **23**: 841–851.
Wyatt R, Broyles SB, Derda GS. **1992**. Environmental influences on nectar production in milkweeds (*Asclepias syriaca* and *A. exaltata*). *American Journal of Botany* **79**: 636–642.
Yu J, Jiang M, Guo C. **2019**. Crop pollen development under drought: From the phenotype to the mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* **20**.
Ziska LH, Pettis JS, Edwards J, *et al.* 2016. Rising atmospheric CO2 is reducing the protein concentration of a floral pollen source essential for North American bees. *Proceedings of the Royal*
Society B: Biological Sciences **283**: 20160414.

7. Supplementary data

Table S1 : list of 55 publications which were selected for the review.

First author	Year	Water stress application method (Slette et al. 2019)	Experimental setups	Plant family	Species
Al-Ghzawi	2009	low_soil_moisture	experimental_inside	Fabaceae	*Trigonnella moabitica*
Arathi	2002	dry	experimental_inside	Phrymaceae	*Mimulus guttatus*
Boutraa	2001	dry	experimental_inside	Fabaceae	*Phaseolus vulgaris*
Brunet	2019	dry	experimental_inside	Ranunculaceae	*Aquilegia coerulea*
Burkle	2016	plant_water_stress	experimental_inside	Campanulaceae ; Rosaceae ; Asteraceae ; Boraginaceae	*Campanula rotundifolia, Heterotheca villosa, Phaceli hastata, Potentilla recta*
Campbell	2019	low_soil_moisture	experimental_inside	Polemionaceae	*Ipomopsis aggregata*
Carroll	2001	plant_water_stress	experimental_inside	Onagraceae	*Epilobium angustifolium*
Carusso	2006	low_soil_moisture	experimental_inside	Lobeliaceae	*Lovbelia siphilitca*
Clearwater	2018	plant_water_stress	experimental_inside	Myrtaceae	*Leptospermum scoparium*
del Cacho	2013	reduced_rainfall	experimental_outside	Fabaceae, Cistaceae, Ericaeae	*Dorycnium pentaphyllum, Helianthemum syriacum, Erica multiflora*
del Valle	2015	dry_seasons	natural	Caryophyllaceae	*Silene littorea*
Descamps	2020	low_soil_moisture	experimental_inside	Boraginaceae	*Echium vulgare, Echium plantagineum*
Descamps	2018	low_soil_moisture	experimental_inside	Boraginaceae	*Borago officinalis*

Edwards	2012	low_soil_moisture	experimental_inside	Brassicaceae	*Brassica rapa*
El Balla	2013	low_soil_moisture	experimental_outside	Alliaceae	*Allium cepa*
Fang	2010	dry	experimental_inside	Fabaceae	*Cicer arietinum*
Franks	2011	low_soil_moisture	experimental_inside	Brassicaceae	*Brassica rapa*
Frazee	1994	plant_water_stress	experimental_inside	Fabaceae	*Chamaecrista fasciculata*
Galen	2000	dry_seasons	natural	Polemoniaceae	*Polemonium viscosum*
Gallagher	2017	low_soil_moisture	experimental_outside	Boraginaceae	*Mertensia ciliata*
Glenny	2018	plant_water_stress	experimental_inside	Campanulaceae ; Rosaceae ; Asteraceae ; Boraginaceae	*Campanula rotundifolia, Heterotheca villosa, Phaceli hastata, Potentilla recta*
Gonzales	2016	reduced_rainfall	experimental_inside	Asteraceae	*Madia sativa*
Guilioni	2003	standardized_index	experimental_inside_outside	Fabaceae	*Pisum sativum*
Guo	2013	low_soil_moisture	experimental_inside	Brassicaceae	*Brassica rapa*
Halpern	2010	plant_water_stress	experimental_inside	Solanaceae	*Nicotiana quadrivalis*
Herrera	2005	dry_seasons	natural	Lamiaceae	*Rosmarinus officinalis*
Heschel	2005	reduced_rainfall	experimental_outside	Balsaminceae	*Impatiens capensis*
Jorgensen	2013	low_soil_moisture	experimental_inside	Plantaginaceae	*Collinsia heterophylla*
Kahl	2019	reduced_rainfall	experimental_inside	Caryophyllaceae	*Silene vulgaris*
Kay	2013	plant_water_stress	experimental_inside	Onagraceae	*Clarkia breweri, Clarkia concinna*

Lambrecht	2007	dry_seasons	natural	Asteraceae, Calochortaceae, Rosaceae	*Achillea millefolium, Chrysanthemum leucanthemum, Hypochaeris radicata, Calochortus subalpinus, Fragaria virginiana*
Lambrecht	2017	dry_seasons	natural	Polemionaceae	*Leptosiphon androsaceus*
Lazaro	2015	dry_seasons AND low_soil_moisture	natural_experimental	Fabaceae	*Senna candolleana (shrub)*
Ma	2014	low_soil_moisture	experimental_inside	Brassicaceae	*Arabidopsis thaliana*
Mal	2005	low_soil_moisture	experimental_inside	Lythraceae	*Lythrum salicaria*
Mantel	2019	low_soil_moisture	natural_experimental	Phrymaceae	*Mimulus guttatus (perennial), M. Guttatus (annual), M. Nasutus (annual)*
Opedal	2016	plant_water_stress	experimental_inside	Euphorbiaceae	*Dalechampia scandens*
Penuelas	2004	low_soil_moisture	experimental_outside	Ericaceae	*Calluna vulgaris, Erica sp.*
Phillips	2018	low_soil_moisture	experimental_outside	Fabaceae, Rosaceae	*Lathyrus pratensis, Onobrychis viciifolia, Prunella vulgaris*
Prieto	2008	low_soil_moisture	experimental_outside	Plantaginaceae, Ericaceae	*Globularia alypum, Erica multiflora*
Qaderi	2012	plant_water_stress	experimental_inside	Brassicaceae	*Brassica napus*
Quinet	2015	low_soil_moisture	experimental_inside	Balsaminaceae	*Impatiens parviflora*
Sanchez	2009	reduced_rainfall	experimental_inside	Geraniaceae	*Pelargonium hortorum*
Sehgal	2019	low_soil_moisture	experimental_inside	Fabaceae	*Lens culinaris*
Sivakumar	2016	low_soil_moisture	experimental_outside	Solanaceae	*Solanum lycopersicon*

Su	2013	low_soil_moisture	experimental_inside	Brassicaceae	*Arabidopsis thaliana*
Suni	2020	low_soil_moisture	experimental_inside	Polemionaceae	*Phlox drummondii*
Teixido	2019	dry_seasons	natural	Cistaceae	*37 species*
Thomson	2016	dry_seasons	natural	Scrophulariaceae	*Scrophularia californica*
Turner	1993	plant_water_stress	experimental_inside	Fabaceae	*Trifolium repens*
Villareal	1990	dry	experimental_inside	Polemionaceae	*Ipomopsis longiflora*
Walter	2020	dry_seasons	natural	grassland species - Fabaceae	*grassland species - Trifolium pratense*
Waser	2016	differs_from_normal	natural	Polemionaceae	*Ipomopsis aggregata*
Wu	2010	low_soil_moisture	experimental_inside	Phrymaceae	*Mimulus guttatus*
Wyatt	1992	reduced_rainfall	experimental_inside	Asclepiadacées	*Asclepias syriaca, A. exaltata*

Partie II : Impacts de la hausse de température et du stress hydrique sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux des 4 espèces modèles (*Borago officinalis*, *Echium plantagineum*, *E. vulgare*, *Impatiens glandulifera*)

Introduction du protocole expérimental

Afin de répondre à la première question de recherche qui concerne l'impact d'une hausse de température combinée à un stress hydrique sur la morphologie, physiologie et les traits floraux d'espèces entomophiles, nous avons sélectionné 4 espèces modèles qui sont toutes hautement attractives pour les pollinisateurs.

Le protocole expérimental pour tester l'influence d'une hausse de température et d'un stress hydrique a été similaire pour les 4 espèces. Il est présenté ci-dessous.

i) Mise en culture en serres

Pour 3 des 4 espèces (*B. officinalis*, *E. plantagineum*, *E. vulgare*), les graines ont été mises en germination durant une semaine dans une chambre de germination (Economic Delux model, Snijders Scientific, Netherlands) à 20°C/18°C (température jour/nuit) avec une photopériode de 16h jour/8h nuit. Lorsque les plantes présentaient 3 feuilles, elles ont été rempotées dans un mélange de terreau (DCM, Netherlands) et de sable à part égales (M PRO, Netherlands). Pour *I. glandulifera*, nous avons été prélever des plantules directement sur le terrain dans deux populations différentes (Jamioulx et Court-Saint-Etienne, Belgique). Celles-ci ont été rempotées dans du terreau (DCM, Netherlands). Les plantes ont ensuite été cultivées dans les serres (Fig. II.1, plateforme SEFY, UCLouvain, Belgique) jusqu'au moment de l'initiation de la floraison (Fig. II.2a, développement de la hampe florale chez les Boraginaceae, bourgeons floraux visibles chez *I. glandulifera*) et arrosées régulièrement. Cette période de culture en serres a duré entre 4 et 6 semaines suivant les espèces.

ii) Chambre de culture : application des traitements

Les plantes ont ensuite été transférées dans les chambres de culture (Fig. II.2b, Fig. II.3). Trois chambres de culture étaient nécessaire afin d'appliquer les trois régimes de température (jour/nuit) : 21°C/19°C, 24°C/22°C et 27°C/25°C. Au sein de chaque chambre de culture, deux régimes hydriques étaient appliqués : un groupe arrosé régulièrement (WW, well-watered) afin de maintenir une humidité du sol au desssus de 30-40% pour les Boraginaceae et au dessus de 50% pour *I. glandulifera* et un groupe mis en stress hydrique (WS, water-stressed) où l'humidité du sol était en dessous de 15% pour les Boraginaceae et de 30% pour *I. glandulifera.* L'humidité du sol était mesurée à l'aide d'une sonde ProCheck (Decagon Devices, Etats-Unis). Le stress hydrique était appliqué après une semaine d'acclimation aux chambres de culture (considérée comme semaine 0). Au total, 6 traitements étaient distingués : 21WW (groupe bien arrosé à 21°C, traitement considéré comme « contrôle »), 21WS (groupe en stress hydrique à 21°C), 24WW (groupe bien arrosé à 24°C), 24WS (groupe en stress hydrique à 24°C), 27WW (groupe bien arrosé à 27°C) et 27WS (groupe en stress hydrique à 27°C). Un minimum de 10 plantes était cultivé par traitement. La photopériode était de 16h jour/8h nuit.

L'humidité relative était maintenue à environ 80% +- 10%. Les lampes étaient de type HPIT 400W (Philips, Belgique) ce qui permettait d'avoir une intensité lumineuse à hauteur de la canopée de 155 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ mesurée à l'aide d'une sonde Quantum Skye Instruments (Hansatech Instruments, Angleterre). L'expérience en chambre de culture a duré 6 semaines. Les expériences ont été dupliquées pour toutes les espèces, excepté *I. glandulifera.*

iii) Mesures morphologiques et physiologiques

Le nombre de nœuds, de feuilles sur la tige principale et sur les ramifications étaient comptés chaque semaine. La hauteur des plantes était mesurée en début et en fin d'expérience, afin de calculer un pourcentage d'accroissement.

Les paramètres physiologiques étaient mesurés au début de l'expérience, et en semaine 2 et 4. Ceux-ci étaient mesurés sur un même nœud pour toutes les plantes, sur 10 plantes par traitement, entre 10h et 15h. Les mesures prises étaient non destructices afin de ne pas influencer le développement des plantes par des prélèvements en cours d'expérience. Seule la mesure des sucres solubles totaux chez *I. glandulifera* a necessité un prélèvement de feuilles pour le dosage. Les paramètres mesurés chez toutes les espèces étaient :

- la teneur en chlorophylle relative (chlorophyll content index, CCI) en utilisant un chlorophyllomètre (Opti-science, CCM-200) ;
- les paramètres liés à l'émission de fluorescence de la chlorophylle (Fv/Fm : rendement quantique maximal du photosystème II, φPSII : rendement quantique du photosystème II, qP : quenching photochimique, NPQ : quenching non photochimique) en utilisant un fluorimètre (FMS II, Hansatech Instruments, Angleterre) ;
- la conductance stomatique (g_s) en utilisant un poromètre (AP4 System, Delta T Devices, Angleterre) ;
- les échanges gazeux (A_i : taux instantané de photosynthèse , E_i : taux instantané de transpiration) en utilisant un analyseur de gaz infrarouge (IRGA ADC BioScientific LCI-SD system, Angleterre), ce qui a permis de calculer l'efficience instantanée d'utilisation de l'eau $WUE_i = A_i/E_i$.

iv) Mesures des traits floraux et ressources florales

Le nombre de fleurs ouvertes par plante était compté chaque semaine. Les dimensions des fleurs (longueur pétale chez *B. officinalis* ou profondeur et ouverture de la corolle chez *E. plantagineum, E. vulgare* et *I. glandulifera*) étaient mesurées au minimum au début de l'expérience, ainsi qu'en semaine 2 et 4 sur 10 fleurs par traitement. Au milieu de l'expérience, 10 fleurs étaient prélevées afin de scanner les corolles pour estimer la surface de cette dernière avec le logiciel Image J.

Le nectar a été prélevé à l'aide de microcapillaires (1, 5 ou 10 µl) sur au minimum 5 fleurs par traitement, en semaine 1, 3 et 5. La concentration totale en sucres a été estimée à

l'aide d'un réfractomètre (Bellingham and Stanley, Angleterre). Le contenu en sucres du nectar par fleur a été estimé en combinant la mesure de volume et de concentration.

Afin d'estimer le nombre de grains de pollen par anthère, 5 anthères provenant de 5 fleurs différentes ont été prélevées et stockées dans une solution de FAA pour être conservées. Les anthères ont ensuites été écrasés et mélangées à une solution de rouge d'Alexander afin de colorer les grains de pollen. Le comptage consistait à prélever 1 µl de solution et compter les grains de pollen sur une lame au microscope (G 400x). La viabilité du pollen a aussi été estimée sur base de 5 anthères provenant de 5 fleurs différentes. Les anthères ont été mises en contact avec une solution de fluorescéine diacétate, ce qui a rendu les grains de pollen viables fluorescents. Les comptages ont été effectués sur un minimum de 200 grains de pollen au microscope (G 400x).



Figure II.1 : Culture de *B. officinalis* (au 1er plan) et de *E. vulgare* (au 2d plan) dans les serres de l'université, deux semaines après leur rempotage (plateforme SEFY, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgique)

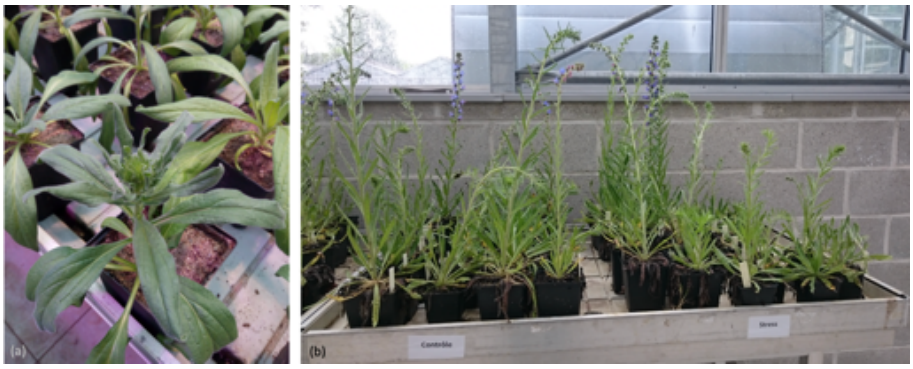


Figure II.2 : transition entre la culture en serres et en chambre de culture : (a) initiation de la hampe florale chez une plante de *E. plantagineum* ; (b) début de la culture en chambre de culture pour deux groupes de *E. vulgare,* considérée comme semaine 0 (plateforme SEFY, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgique)



Figure II.3 : Culture de *B. officinalis* (au 1er plan) et de *E. vulgare* (au 2^{d} plan) dans la chambre de culture à 21°C(phytotrons, plateforme SEFY, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgique)

Chapter 2 : Temperature and water stress affect plant-pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae)

Ce chapitre 2 consacré à une de nos 4 espèces modèles, *Borago officinalis* (Fig. II.4), décrit l'impact de la hausse de température et du stress hydrique sur la morphologie, la physiologie, les traits floraux ainsi que les répercussions sur le comportement des pollinisateurs. Ce chapitre a été publié.

Descamps, C., Quinet, M., Baijot, A., & Jacquemart, A. L. (2018). Temperature and water stress affect plant-pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecology and evolution*, *8*(6), 3443–3456. https://doi.org/10.1002/ece3.3914

L'objectif était de mettre au point le protocole expérimental et d'avoir une première vue « globale » des résultats par rapport aux trois questions de recherche, à savoir 1) les impacts sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux, 2) les impacts sur les quantités et composition des ressources florales et 3) les impacts sur le comportement des insectes pollinisateurs (Fig. II.5). Ces résultats sont synthétisées dans les paragraphes qui suivent en fonction des questions de recherche.

Après un premier essai en juillet 2015 avec l'aide d'Aurélie Baijot (Master Bioingénieur), nous avons répété l'expérience en juillet 2016. Nous avons suivi le protocole décrit en introduction de la partie II. A l'issue de l'expérience en chambre de culture, après 6 semaines, nous avons exposé 3 plantes par traitement aux pollinisateurs à l'extérieur et nous avons suivi le parcours de 33 bourdons sur ces plantes. Nous avons noté les fleurs visitées en suivant l'ordre du parcours. Ceci nous a permis de calculer un taux de visite par plante (nombre de fleurs visitées par heure divisé par le nombre de fleurs sur la plante. Notre hypothèse de départ était que la hausse de température, combinée au stress hydrique, affecte la croissance et les processus physiologiques, ce qui conduit à une diminution de ressources florales ; cette diminution se répercute sur le comportement de visite des pollinisateurs. Nous avons abordé 3 questions à savoir : i) Est-ce la température et le stress hydrique interagissent au niveau des fonctions de la plante (croissance et physiologie de la plante) ? ii) Est-ce que ces stress influencent directement les traits floraux et les ressources florales ou est-ce que ces effets sont modulés via une influence indirecte sur la croissance et processus physiologiques ? iii) Est-ce que ces stress modifient le comportement de visite des insectes ?



Figure II.4 : Photos de *Borago officinalis* : (a) plante entière (A. Baijot, 2015) ; (b) inflorescence avec une fleur ouverte visitée par Apis mellifera (S. Hugon, 2015)

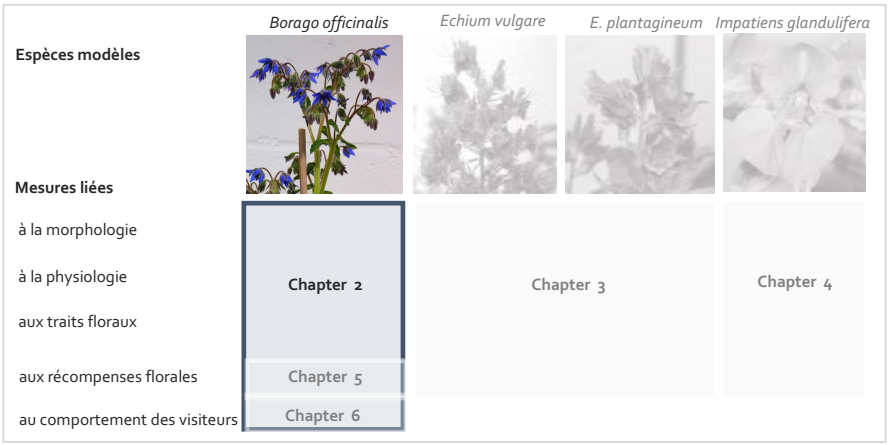


Figure II.5 : Schéma conceptuel de l'organisation des chapitres 2 à 6 de la thèse en fonction des thèmes explorés et des espèces modèles. L'encadré bleu correspond au chapitre d'intérêt.

1) Les impacts sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux

La phase reproductive était impactée à la fois par la hausse de température et le stress hydrique, comparé aux paramètres végétatifs qui étaient surtout affectés par la température, particulièrement à 27°C (en annexe, les Fig. II.6 et II.7 illustrent le développement des plantes au début de l'expérience et après 3 semaines d'expériementation pour les 6 traitements). Le nombre de feuilles matures a été réduit par les deux stress et ces derniers ont stimulé le développement de ramifications, en particulier à 24WS. La teneur relative en chlorophylle des feuilles a été nettement impactée par la hausse de température, diminuant de plus de 40% à 27°C. Des effets négatifs sur les traits floraux ont été observés comme une diminution du nombre de fleurs (15 fleurs en moyenne pour les groupes bien arrosés et 8 fleurs pour les groupes en stress hydrique) et de leur taille (3.8 cm^2 à 21WW et 2.2 cm^2 à 27WS). Les effets du stress hydrique s'additionnaient aux impacts de la hausse de température. Nous avons en outre observé des modifications de la morphologie florale (en annexe, Fig. II.8).

2) Les impacts sur les quantités et composition des ressources florales

Le volume de nectar a été réduit par les stress (environ 6.5 µl à 21WW et 2 µl à 27WS) ainsi que les quantités de sucres contenus dans le nectar par fleur (environ 3.9 mg par fleur à 21WW et 1.3 mg mg par fleur à 27WS). La quantité totale de pollen n'a pas affectée par les stress ; mais la viabilité a fortement diminué (environ 79% à 21WW et 25% à 27WS).

3) Les impacts sur le comportement des insectes pollinisateurs

Les bourdons face aux plantes après 6 semaines de traitement, visitaient de préférence les plantes 21WW ; le taux de visite était de 5 fleurs par plante par heure comparé au taux de visite des plantes des autres traitements qui était inférieur à 3 fleurs par plante par heure.

Temperature and water stress affect plant-pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae)

Charlotte Descamps, Muriel Quinet, Aurélie Baijot, Anne-Laure Jacquemart

Research Group « Genetics, Reproduction, Populations », Earth and Life Institute–Agronomy, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Correspondence : Charlotte Descamps, email: charlotte.descamps@uclouvain.be

Descamps, C., Quinet, M., Baijot, A., & Jacquemart, A. L. (2018). Temperature and water stress affect plant-pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecology and evolution*, *8*(6), 3443–3456. https://doi.org/10.1002/ece3.3914

Abstract

Climate change alters the abiotic constraints faced by plants, including increasing temperature and water stress. These changes may affect flower development and production of flower rewards, thus altering plant–pollinator interactions. Here, we investigated the consequences of increased temperature and water stress on plant growth, floral biology, flower-reward production, and insect visitation of a widespread bee-visited species, Borago officinalis. Plants were grown for 5 weeks under three temperature regimes (21, 24, and 27°C) and two watering regimes (well-watered and water- stressed). Plant growth was more affected by temperature rise than water stress, and the reproductive growth was affected by both stresses. Vegetative traits were stimu- lated at 24°C, but impaired at 27°C. Flower development was mainly affected by water stress, which decreased flower number (15 ± 2 flowers/plant in well-watered plants vs. 8 ± 1 flowers/plant under water stress). Flowers had a reduced corolla sur- face under temperature rise and water stress (3.8 ± 0.5 cm2 in well-watered plants at 21°C vs. 2.2 ± 0.1 cm2 in water-stressed plants at 27°C). Both constraints reduced flower-reward production. Nectar sugar content decreased from 3.9 ± 0.3 mg/flower in the well-watered plants at 21°C to 1.3 ± 0.4 mg/flower in the water-stressed plants at 27°C. Total pollen quantity was not affected, but pollen viability decreased from 79 ± 4% in the well-watered plants at 21°C to 25 ± 9% in the water-stressed plants at 27°C. Flowers in the well-watered plants at 21°C received at least twice as many bum- blebee visits compared with the other treatments. In conclusion, floral modifications induced by abiotic stresses related to climate change affect insect behavior and alter plant–pollinator interactions.

Keywords : *Borago officinalis,* flower rewards, high temperature, nectar, pollen, water stress

1. Introduction

Temperature and water stresses are two abiotic constraints that natural systems face in the context of climate changes. Modifications in temperature and precipitation regimes affect plant and animal physiology, phenology, and, consequently, perturb the interactions between partners, such as between plants and their pollinators (Potts et al., 2010; Schweiger et al., 2010; IPCC, 2014; Gray et al., 2016; Forrest, 2017). To date, most studies investigating the effects of temperature and water stress on plant-pollinator interactions focus on plant and insect phenology and distribution (Hegland et al., 2009; Bartomeus et al., 2011; González-Varo et al., 2013; Settele et al., 2016). But few studies consider the effects of these abiotic constraints on plant-pollinator interactions via plant physiological processes, although modifications at the plant level could have consequence on floral traits and floral-reward availability (Scaven & afferty, 2013; Mu et al., 2015; Parmesan & Hanley, 2015; Takkis et al., 2015).

High temperatures and water stress alter many physiological processes during the plant life cycle and affect plants at the molecular, cellular, and organismal level (Wahid et al., 2007; Barnabás et al., 2008; Hedhly, 2011; Pandey et al., 2015). Increases in temperature induce heat stress when temperatures suddenly increase above the optimal growth temperature, causing stressful conditions and having negative consequences on vegetative growth (Prasad et al., 2008). The effect of these abiotic stresses depends on the duration and intensity of the stress (Wahid et al., 2007; Zinn et al., 2010). High temperature and water stress can produce common or specific effects (Pandey et al., 2015), the combination of both stresses can have a stronger effect on plants than each stress alone (Rizhsky et al., 2002; Barnabás et al., 2008). Both stresses lead to a reduction in photosynthesis (Pandey et al., 2015). Water stress leads to stomatal closure, reducing water potential and CO2 uptake, thus leading to inhibition of photosynthesis (Barnabás et al., 2008; Khan et al., 2010; Prasch & Sonnewald, 2015). High temperature stress damages Photosystem II (PSII) (Prasad et al., 2008). The combination of the two stresses has a 3 deleterious effect on photosynthetic activity (Rizhsky et al., 2002; Pandey et al., 2015; Prasch & Sonnewald, 2015). Regarding vegetative growth, high temperature and water stress have mainly contrasting effects (Pandey et al., 2015). Plants tolerate water stress by reducing water loss and increasing water uptake, by reducing leaf number and leaf area, and increasing root growth (Connor & Jones, 1985; Berger et al. 2016). Plants tolerate high temperatures by increasing their transpiration rate, including by increasing leaf number and area (Prasad et al., 2008). Under temperature rise, plant height can be reduced (Qaderi et al., 2012). Both stresses affect therefore vegetative traits.

In addition to an indirect effect via inhibition of photosynthesis, high temperature and water stress also directly affect reproductive growth which is even more sensitive to abiotic constraints than the vegetative growth (Prasad et al., 2008; Zinn et al., 2010; Hedhly, 2011; Snider & Oosterhuis, 2011). These abiotic stresses can cause floral bud abortion and reduce flower number, leading to decreased reproductive success (Morrison & Stewart, 2002; Muhl et al., 2013). They can also affect the size of floral organs (Carroll et al., 2001; Koti et al., 2005; Sato et al., 2006). These abiotic stresses, if they occur during flowering, limit floral rewards. High temperature and water stress affect nectar production through changes in nectar volume and sugar concentration. Nectar volume generally increases with increasing temperature, up to a species-specific optimum temperature (Nicolson & Susan, 2007). Above this optimum temperature, nectar volume decreases (Mu et al., 2015). In response to water stress, nectar volume generally decreases (Caroll et al., 2001). Temperature rise and water stress seem to have less effect on sugar concentration (Caroll et al., 2001; Mu et al., 2015). They affect also pollen development and viability, which could perturb fertilization and seed development (Barnabás et al., 2008; Hedhly, 2011; Snider & Oosterhuis, 2011). Such modifications in pollen production mainly involve: (i) a reduction in the numbers of mature pollen grains; (ii) abnormal pollen development, leading to decreased viability and germination capacity; and (iii) abnormal anther morphology, leading to reduced pollen transfer (Hedhly, 2011; Devasirvatham et al., 2012; Sage et al., 2015; Bishop et al., 2016). Both stresses applied

during reproductive development lead to a reduction of fruit and seed sets (Hedhly, 2011; Pandey et al., 2015).

The modifications of floral traits and floral rewards due to temperature rise and water stress could have consequences on plant-pollinator interactions because flowers and floral rewards are key elements affecting pollinator abundance and activity (Potts et al., 2003). Nectar provides the main sugar source for insect pollinators (Nicolson & Susan, 2007). The volume and total sugar concentration determine the energetic value of the nectar for insects (Cnaani et al., 2006; Nicolson & Thornburg, 2007). Pollen is the principal source of polypeptides, amino acids, and phytosterols (Roulston et al., 2000; Hanley et al., 2008; Cane, 2016). Flower rewards with higher quality (high sugar content in nectar, high polypeptide content in pollen) and quantity, are more attractive to pollinators (Cartar, 2004; Kudo et al., 2005; Somme et al., 2014; Bailes et al., 2015; Zhao et al., 2016), whereas rewards with lower quality or quantity are less attractive (i.e., reduced pollinator abundance and activity) (Larsson et al., 2007; Wallidevries et al., 2012). Therefore, modifications of floral traits and flower rewards might alter the attractiveness of flowers to pollinators (Scaven & Rafferty, 2013; Forrest, 2017). Such modifications to plant–pollinator interactions affect both partners (Scaven & Rafferty, 2013; Roger et al., 2016, 2017).

The aim of this study was to understand how floral traits and flower rewards could be affected by temperature rise and water stress through plant physiological procesess and, eventually, how insects modify visitation behavior. Our hypothesis was that increases in temperature and drought affect plant growth and physiology, leading to decreased floral-reward production; reduction in flower rewards will modify insect visitation behavior. We tested this hypothesis on an entomophilous species, Borago officinalis, that is broadly distributed and attractive to insects. We adressed three questions: (1) Do temperature and water stresses interact in their effects on plant functions? (2) Do these stresses influence directly floral traits and floral rewards or is this response mediated through influence on growth and physiology? (3) Do these stresses modify flower visitation by insects?

2. Material and methods

2.1. Plant material and growth conditions

B. officinalis is an annual, entomophilous plant (60–90 cm), with a large floral display. Its native range is the Mediterranean region. The flowering period extends from June to September and about hundred flowers are produced per plant. Flowers are grouped in terminal inflorescences that form scorpioid cymes. Flowers are hermaphroditic, 5-merous, and actinomorphic. Petal colour changes from pink to blue during anthesis that lasts about 3 days. B. officinalis is mainly pollinated by bumblebees and honeybees, which represent 80% of insect visits (Thom et al. 2016; A.Baijot, pers. obs.).

B. officinalis seeds were provided by Vilmorin nursery (Saint-Quentin, France). Seeds were placed in a germination chamber (Economic Delux model ECD01E; Snijders Scientific, Tilburg, Netherlands) under 20°C/18°C day/night temperature and a 16-h light (L): 8-h dark (D) photoperiod. Seedlings at the three-leaf stage were transplanted into 2 L pots filled with a 1:1 (v/v) mix of sand (size 0/5, M PRO, Netherlands) and universal peat compost (DCM, Amsterdam, Netherlands), and grown in the greenhouse at the University campus (Louvain-la-Neuve 50°39'58"N; 4°37'9"E, Belgium). They were watered daily with rainwater until the beginning of the experiment. Treatments were applied at floral transition, 4 weeks after sowing. At this stage, bolting occurred, flowering stem developed, and the first floral buds were visible. Plants were subjected to three temperature regimes (21°C, 24°C, 27°C) and two watering regimes (watering vs. water stress) to investigate the main effects of temperature and water stresses and their interactions. In total, six treatments were applied to 13 plants per treatment : 21°C well-watered (21WW), 21°C water-stressed (21WS), 24°C well-watered (24WW), 24°C water-stressed (24WS), 27°C well-watered (27WW), and 27°C water-stressed (27WS). In total, 78 plants were monitored in three growth chambers under three temperature regimes (day/night): 21/19°C, 24/22°C, and 27/25°C. Photoperiod was 16L:8D, relative humidity was maintained at 80 ± 10%. Light was supplied by Philips HPIT 400 W lamps (Philips Lighting S.A., Brussels, Belgium) and light irradiance was at 155 ± 20 μmol m-2 s-1 at canopy level (Skye Instruments Quantum Sensor quantum meter; Hansatech Instruments, Norfolk, United Kingdom). Each growth chamber was divided into two parts to accommodate two watering regimes. The well-watered plants received daily watering (soil humidity about 30%), whereas the water-stressed plants were watered twice a week (soil humidity lower than 15%). Growth chamber experiments lasted six weeks. Water stress was applied after one week of acclimation to the growth chambers (this week was considered week 0). Soil water content was quantified with a Procheck sensor hand-held reader (Decagon Devices, Pullman, USA). Experiments were repeated twice on consecutive years.

2.2. Vegetative trait measurements

The number of nodes and leaves were counted once a week on 10 plants per treatment during the six-week experiment. The number of nodes on the main stem was counted as soon as the flowering stem developed. Green leaves (> 2 cm), floral buds (> 0.5 cm), and flowers at anthesis were quantified per node separately on the main stem and on branched shoots, called ramifications. Stem and ramification lengths were measured at the end of the experiment (i.e., five weeks after the stress induction), between the first and last node.

2.3. Physiological parameters

Physiological measurements were performed on the 5th-node leaf of 10 plants per treatment, between 10 A.M. and 3 P.M., at the beginning of the experiment, and two and

four weeks after inducing stress. The measured parameters were chlorophyll fluorescence, chlorophyll content, stomatal conductance (gs), and gas exchange.

Chlorophyll fluorescence was monitored using a fluorescence monitoring system fluorometer (FMS II; Hansatech Instruments, Norfolk, United Kingdom). The quantified parameter was PSII efficiency (ΦPSII), which measures the proportion of light absorbed by PSII that is used in photochemistry (Maxwell & Johnson, 2000). Leaf portions were dark-adapted for 30 min before illumination with a first pulse at 18,000 mmol m-2 s-1 followed by a constant level of actinic light (660 mmol m-2 s-1) for 2 min. A second saturating pulse of 18,000 mmol m-2 s-1 was subsequently applied. Chlorophyll content index (CCI) was measured using a chlorophyllometer (Opti-Sciences, CCM-200) and the measurement was taken three times on the same leaf. An automatic porometer (AP4 System, Delta-T Devices) was used to measure gs on the abaxial surface of the leaf.

Gas exchanges (instantaneous photosynthetic (Ai,) and transpiration rate (Ei)) was measured using an infrared gas analyzer (IRGA ADC BioScientific LCI-SD system, serial No.33413, Hoddesdon, United Kingdom). Temperature and relative humidity in the cuvette were set at 21, 24, or 27°C according to the growth chamber and 70 ± 5%, respectively. Instantaneous water use efficiency (WUE) was calculated as WUE=A/E.

2.4. Flower trait and flower reward measurements

The numbers of floral buds (> 0.5 cm) and flowers at anthesis were counted once a week on 10 plants per treatment during the six-week experiment. They were quantified per node separately on the main stem and on ramifications. The petal length was measured on 10 random flowers from separate plants per treatment once a week. Petal length was measured as the length between nectaries and petal apex. Moreover, three weeks after inducing stress, flowers were dissected and all organs were separated and scanned. Their dimensions were estimated by scan analysis using ImageJ software. During the experiment, modifications of flower shape and/or morphology were observed and abnormal flowers were counted.

One anther per flower was collected from six random flower buds per treatment (from different individuals) one day before anthesis, and stored in FAA solution (70% ethanol, glacial acid acetic, 35% formaldehyde; 18:1:1). To count the number of pollen grains per anther, anthers were crushed separately and placed in microfuge tubes containing 50 µl Alexander's stain. Tubes were then vortexed to disperse pollen grains in the solution. A subsample of 1 µl was used to count all pollen grains on a microscope slide under a light microscope (Nikon Eclipse E400, G 400x). Counts were performed in triplicate for each anther and were performed three weeks after induction of the stress. Pollen viability was assessed using fluorescein diacetate (Dafni et al., 2005). Five flowers per treatment were randomly collected a few hours after their opening; one anther per flower was removed and added to fluorescein diacetate solution. Pollen viability was determined using a

minimum of 200 pollen grains per sample. Counts were performed in triplicate for each anther. Pollen viability was estimated three weeks after induction of the stress.

Nectar was extracted with 10 μL glass capillary tubes (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) from five flowers per treatment (flowers from five different plants). Total sugar concentration (C, g sucrose/100 g solution) was measured with a low-volume hand refractometer (Eclipse handheld refractometer; Bellingham and Stanley, Tunbridge Wells, United Kingdom). Nectar sugar content per flower (s, mg) was calculated as $s = 10 \times d \times v \times C$, where d is the density of a sucrose solution at concentration C ($d = 0.0037921 \times C + 0.0000178 \times C^2 + 0.9988603$) and v is nectar volume (mL) (Prys-Jones & Corbet, 1991).

2.5. Insect visitor observations

Five weeks after induction of stress, three plants per treatment (with 8–12 blue flowers per plant) were exposed outside to insect visitors at the University experimental garden, on 4 m^2 observation plots. Plants were identified according to their previous stress treatment. Bumblebee visits were recorded during sunny days (between 10 A.M. and 4 P.M., 25°C on average). In total, we followed 33 bumblebee individuals for a total of 1148 flower visits over 164 min. Individuals were followed during all their visits to flowers in the observation plots. During tracking, relative position of the successive visited plant, plant identity, and the number of flowers visited per plant were recorded. For each plant treatment, visitation rate was extrapolated as the number of visited flowers per plant during 60 min divided by the number of flowers on the plant. The mean number of visited flowers per plant and per bumblebee was also compared among stress treatments.

2.6. Statistical analyses

Normality of the data was estimated using QQ plots and Shapiro-Wilk test. Linear mixed models and analysis of variance (type II) were performed to a significance level of $P<0.05$ to evaluate the effects of temperature rise and water stress. For repeated measurements on the same plant at a time-point (chlorophyll content measurements, pollen number, and viability), linear mixed models were made with two fixed factors and their interaction (temperature × water) and plants as the repeated factor. Linear mixed models were made with three fixed factors (temperature × water × week) and plants as the repeated factor, to analyse repeated measurements over time on the same plants (number of stem leaves, ramification leaves, and open flowers). Analysis of variance were performed to analyse data at each time-point. Tukey's test was performed for post hoc analyses. Chi-squared test was used to compare proportions of ramifications under and above the first node to the flower. To identify correlations between physiological, vegetative and floral biology parameters, principal component analysis (PCA) and Pearson correlation plots were performed. All analyses were performed with R 3.2.1, using package *car* for F-test,

package *lme4* for linear mixed models, package *FactomineR* for PCA and package *corrplot* for correlations. Data are presented as means ± standard errors (SE).

3. Results

3.1. Vegetative traits

The length and the number of nodes on the main stem depended on the temperature (Table 1). The length of main stem was the highest at 24°C and lowest at 27°C. The number of nodes was also the lowest at 27°C. The final number of leaves on the main stem decreased with both temperature rise ($F_{2,54}$=43.98, P<0.001) and water-stress treatments ($F_{1,54}$=4.02, P=0.05, Fig. 1a).

The development of ramifications was stimulated by both temperature rise and water stress (Table 1). Plants branched the most in the 24WS treatment. Similarly, the number of leaves on the ramifications ($F_{2,54}$=8.41, *P*<0.001) was significantly higher for this treatment, compared to those at 21°C (Fig. 1b). Most of the ramifications (71 ± 7%) developed below the first inflorescence (χ^2=12.43, df=5, *P*=0.029), regardless of treatment. As a result at 27°C, most of the remaining leaves were ramifications leaves (Temp : $F_{2,54}$=12.24, *P*<0.001 ; Water : $F_{1,54}$=2.88, *P*=0.09). Ramification development discriminated the water-stressed treatments, particularly the 24WS treatment.

Table 1 Effects of temperature rise and water stress on vegetative traits, five weeks after induction of stress.

Treatment[1]	Length of main stem (cm)	Nodes on main stem	Number of ramifications
21WW	56.8 ± 2.9 ab	22.8 ± 0.9 ab	5.2 ± 0.5 c
21WS	52.1 ± 1.9 b	24.2 ± 1 a	8.2 ± 0.8 abc
24WW	64.7 ± 4 a	22.1 ± 0.8 ab	7.7 ± 0.7 abc
24WS	57.9 ± 2.1 ab	23.4 ± 0.9 ab	10.7 ± 0.7 a
27WW	49.3 ± 1.8 b	20.8 ± 0.6 b	7.4 ± 0.6 bc
27WS	51.3 ± 2.3 b	20.8 ± 0.6 b	9.1 ± 0.9 ab
Temp.[2]	$F_{2,54}$=9.13; P<0.001	$F_{2,54}$=5.97; P=0.005	$F_{2,54}$=6.17; P=0.003
Water	$F_{1,54}$=2.22; P=0.14	$F_{1,54}$=1.87; P=0.18	$F_{1,54}$=19.15; P<0.001
Temp.×Water	$F_{2,54}$=1.56; P=0.22	$F_{2,54}$=0.47; P=0.63	$F_{2,54}$=0.55; P=0.58

[1] N=10. Data are means ± SE. Data points followed by different letters for a same parameter are significantly different at P<0.05 among treatments. 21=21°C; 24=24°C; 27=27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed.

[2] Two-way ANOVA results, testing for the main and interactive effect of temperature (Temp.) and water treatments

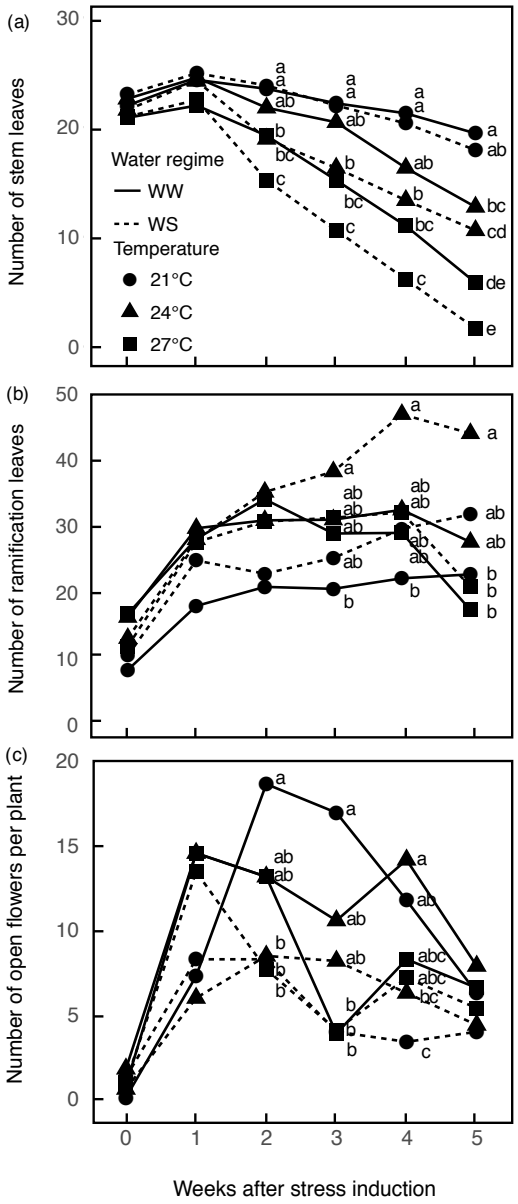


Fig. 1 Effects of temperature rise and water stress on the evolution of : (a) number of leaves on the main stem; (b) number of leaves on the ramifications; (c) number of open flowers per plant. *N*=10. Data are means. Data points followed by different letters are significantly different at $P<0.05$ among treatments at a time-point. WW, well-watered; WS, water-stressed.

3.2. Photosynthesis-related parameters

Physiological parameters were more affected by temperature than by water stress (Table 2). Regarding photosynthesis, chlorophyll content of leaves decreased by more than 40% at 27°C compared to 21°C and 24°C. ΦPSII and the maximum potential quantum efficiency of PSII (Fv/Fm; $F_{2,52}$=9.35, P<0.001, data not shown) were reduced at 27°C. However, A_i increased with increasing temperature. Concerning gas exchange, g_s was significantly higher at 24°C compared to the other temperatures. Both temperature and water stress affected E_i; E_i was higher at 24°C and decreased with water stress. Because of A_i and E_i, the lowest instantaneous WUE was observed at 24°C and the highest at 27°C. The instantaneous WUE increased with water stress.

Table 2 Effects of temperature rise and water stress on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence parameters, and gas exchange two weeks after inducing stress. N=10. Data are means ± SE. Data points followed by different letters for a same parameter are significantly different at P<0.05 among treatments. 21=21°C; 24=24°C; 27=27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed. Temp., Water, Temp. x Water : two-way ANOVA results, testing for the main and the interactive effect of temperature (Temp.) and water treatments. Abbreviations : ΦPSII – Photosystem II efficiency; g_s – stomatal conductance; A_i – instantaneous photosynthetic rate; E_i – instantaneous transpiration rate; WUE – water use efficiency.

Treatment	Chlorophyll content (-)	ΦPSII (-)	g_s (mmol. $m^{-2}.s^{-1}$)	A_i ($\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	E_i ($mmol.m^{-2}.s^{-1}$)	WUE (A/E) ($\mu mol\ CO_2$. $mmolH_2O^{-1}$)
21WW	21.9 ± 1.9 a	0.82 ± 0.01 a	58 ± 4 c	1 ± 0.19 ab	1.07 ± 0.05 bc	0.95 ± 0.25 ab
21WS	19 ± 3.2 ab	0.82 ± 0.01 a	32 ± 3 c	0.74 ± 0.13 b	0.53 ± 0.06 c	1.36 ± 0.24 a
24WW	23.4 ± 3 a	0.79 ± 0.01ab	265 ± 64 a	0.96 ± 0.14 b	2.03 ± 0.21 a	0.47 ± 0.1 b
24WS	20.9 ± 2.2 ab	0.79 ± 0.01ab	212 ± 33 ab	1.37 ± 0.38 ab	1.42 ± 0.19 ab	0.86 ± 0.23 ab
27WW	13.2 ± 2 ab	0.75 ± 0.02 b	109 ± 14 bc	2.01 ± 0.32 a	1.62 ± 0.2 ab	1.27 ± 0.23 a
27WS	11.3 ± 2.6 b	0.75 ± 0.02 b	73 ± 12 c	1.36 ± 0.23 ab	1.01 ± 0.15 bc	1.39 ± 0.26 a
Temp.	$F_{2,54}$=8.95; *P*<0.001	$F_{2,52}$=11.48; *P*<0.001	$F_{2,54}$=22.35; *P*<0.001	$F_{2,54}$=5.56; *P*=0.006	$F_{2,54}$=17.68; *P*<0.001	$F_{2,54}$=9.10; *P*<0.001
Water	$F_{1,54}$=1.46; *P*=0.23	$F_{1,52}$=0.01; *P*=0.92	$F_{1,54}$=2.39; *P*=0.13	$F_{1,54}$=0.58; *P*=0.45	$F_{1,54}$=20.72; *P*<0.001	$F_{1,54}$=5.48; *P*=0.023
Temp. × Water	$F_{2,54}$=0.02; *P*=0.97	$F_{2,52}$=0.01; *P*=0.99	$F_{2,54}$=0.11; *P*=0.9	$F_{2,54}$=2.26; *P*=0.11	$F_{2,54}$=0.02; *P*=0.98	$F_{2,54}$=0.49; *P*=0.62

3.3. Flower traits

The number of floral buds decreased with increasing temperature (Table 3). Furthermore, more than 50% of the floral buds aborted on water-stressed plants so that the number of open flowers was lower for these treatments compared to well-watered plants (Fig. 1c). Differences in the number of open flowers between water-stressed and well-watered plants were particularly visible two weeks after induction of stress. On average, eight flowers were open at the same time per water-stressed plant compared to 15 flowers per well-watered plant. Three weeks after induction of stress, flower production decreased in all treatments, especially 27WW. The pattern of flower production along the main stem was not significantly modified by temperature rise ($F_{2,54}$=1.62, P=0.21) or water stress ($F_{1,54}$=3.16, P=0.08).

Temperature rise and water stress affected flower morphogenesis and shape. Petal length decreased with water stress (Table 3) but not with temperature rise, while corolla surface area (Table 3) decreased with both temperature and water stress. It was reduced by 40% in 27WS compared to 21WW. Three weeks after induction of stress, flower abnormalities were observed in response to temperature rise, particularly at 27°C (Table 3).

Table 3 Effects of temperature rise and water stress on parameters related to floral biology three weeks after induction of stress. N= 10. Data are means ± SE. Data points followed by different letters for a same parameter are significantly different at P<0.05 among treatments. 21=21°C; 24=24°C; 27=27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed. Temp., Water, Temp. x Water : two-way ANOVA results, testing for the main and the interactive effect of temperature (Temp.) and water treatments.

Treatment	Number of floral buds	Petal length (cm)	Corolla surface area (cm^2)	Abnormal flowers (%)
21WW	89 ± 4 a	1.69 ± 0.05 a	3.77 ± 0.45 a	1.3 ± 0.5 b
21WS	70 ± 9 ab	1.51 ± 0.04 ab	3.67 ± 0.11 a	4.1 ± 2 ab
24WW	60 ± 6 ab	1.64 ± 0.03 a	3.22 ± 0.08 ab	6.6 ± 2.3 ab
24WS	69 ± 10 ab	1.38 ± 0.06 b	2.69 ± 0.18 ab	4.3 ± 2.2 ab
27WW	57 ± 6 b	1.60 ± 0.04 a	3.09 ± 0.42 ab	10.7 ± 2.2 a
27WS	50 ± 7 b	1.38 ± 0.06 b	2.23 ± 0.07 b	10.1 ± 2.7 a
Temp.	$F_{2,54}$=6.44; *P*=0.003	$F_{2,54}$=2.7; *P*=0.08	$F_{2,24}$=8.11; *P*=0.002	$F_{2,54}$=6.86; *P*=0.002
Water	$F_{1,54}$=0.9; *P*=0.34	$F_{1,54}$=28.69; *P*<0.001	$F_{1,24}$=5; *P*=0.03	$F_{1,54}$=0.002; *P*=0.96
Temp. x Water	$F_{2,54}$=1.92; *P*=0.15	$F_{2,54}$=0.39; *P*=0.68	$F_{2,24}$=0.99; *P*=0.39	$F_{2,54}$=0.76; *P*=0.47

3.4. Flower rewards

Nectar volume decreased with both temperature ($F_{2,52}$=25.06, P<0.001) and water stress ($F_{2,52}$=11.69, P=0.001, Fig. 2a). As a result, nectar volume decreased by 70% under 27WS compared to 21WW. Sugar concentration was affected by temperature rise ($F_{2,52}$=11.25, P<0.001) but not water stress ($F_{1,52}$=0.18, P=0.68, Fig. 2b); their effects varied according to treatment ($F_{2,52}$=4.31, P<0.001). The highest sugar concentration was recorded at 27°C. This high sugar concentration did not balance the low nectar volume observed for this temperature; total sugar content per flower was four times lower at 27°C than at 21°C. As with nectar volume, total sugar content of nectar decreased with both temperature rise ($F_{2,52}$=14.96, P<0.001) and water stress ($F_{2,52}$=10.67, P=0.002, Fig. 2c).

The total number of pollen grains per anther was not significantly affected by temperature rise ($F_{2,29}$=1.86, P=0.17) or water stress ($F_{1,29}$=0.0004, P=0.98) and was on average 12700 ± 4800. However, pollen viability was significantly reduced by temperature rise ($F_{2,29}$=12.96, P<0.001) and water stress ($F_{1,30}$=7.83, P=0.009, Fig. 2d). The pollen viability was about 80% at 21°C and dropped to less than 60% at 27°C. The impact of water stress was mainly observed at 27°C where pollen viability decreased by 50% between well-watered and water stressed plants.

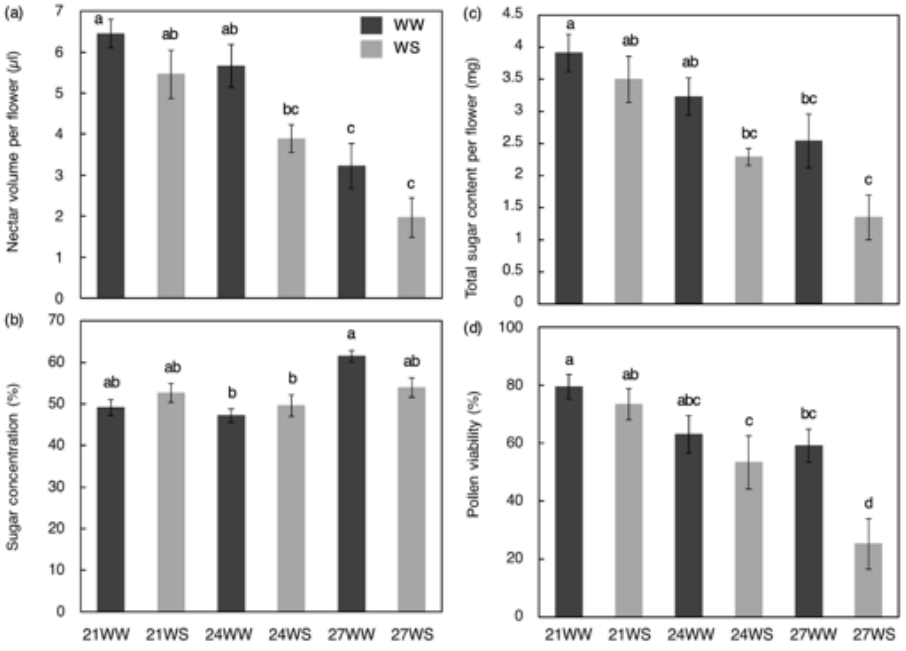


Fig. 2. Impacts of temperature rise and water stress on floral-reward production: (a) nectar volume per flower (µL); (b) sugar concentration in nectar (%); (c) total sugar content in nectar per flower (mg); (d) pollen viability (%). N=10 plants. Data are means ± SE. Treatments followed by different

letters are significantly different at $P<0.05$. 21=21°C; 24=24°C; 27=27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed.

3.5. Flower visitation by bumblebees

Regardless of treatment, an individual bumblebee visited on average 35 flowers in 5 minutes. Flower visitation rate was affected by temperature rise ($F_{2,12}=17.56$, $P<0.001$) depending on watering regime (interaction effect of Temp. × Water, $F_{2,12}=23.01$, $P<0.001$) and was higher for 21°C plants than for the other plants (Fig. 3a). For plants grown at 21°C, 21WW plants were more visited than 21WS plants, while for plants grown at 27°C, there were more visits to 27WS plants than to 27WW. The number of visited flowers per plant before moving to the next plant also depended on the combination between temperature and water regime (interaction effect of Temp. × Water, $F_{2,12}=19.34$, $P=0.002$; Fig. 3b); water stress decreased the number of visited flowers at 21°C and increased it at 27°C. In general, bumblebees visited more flowers per plant before moving to the next plant on 27WS plants compared to the other treatments.

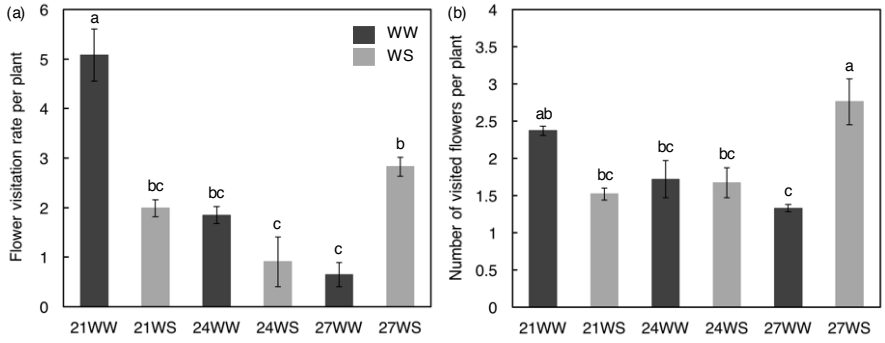


Fig. 3 Impacts of temperature rise and water stress on bumblebee visits (*N* visits= 1148): (a) flower visitation rate per plant expressed as the number of visits per flower per hour; (b) number of visited flowers per plant expressed as the number of flowers visited per bumblebee individual before it moved to the next plant. Data are means ± SE. Treatments followed by different letters are significantly different at $P<0.05$. 21=21°C; 24=24°C; 27=27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed.

3.6. Principal component and correlation analyses

The PCA showed that 75% of the variance was explained by principal component 1 (Axis 1) and principal component 2 (Axis 2) (Fig. 4a, b). The parameters were more discriminated by temperature rise than by water stress. Axis 1 highlighted the differences between 21°C and 27°C and separated the two treatments based on the number of leaves on the main stem, the efficiency of PSII, the number of floral buds and flowers, the corolla surface, the nectar volume and the pollen viability that were the highest at 21°C and WUE that was the highest at 27°C. Axis 2 discriminated 24°C from the other

temperatures due to higher values of the physiological parameters (g_s and E_i), stem length and ramification development.

As shown on Fig. 4c, the nectar sugar quantity was positively correlated with the development of the main stem, the photosynthetic parameters (chlorophyll content, Ai) and the flower size, while it was negatively correlated with the development of ramifications. The flower visitation rate was mainly correlated with the amount of sugars in the nectar (Fig. 4d).

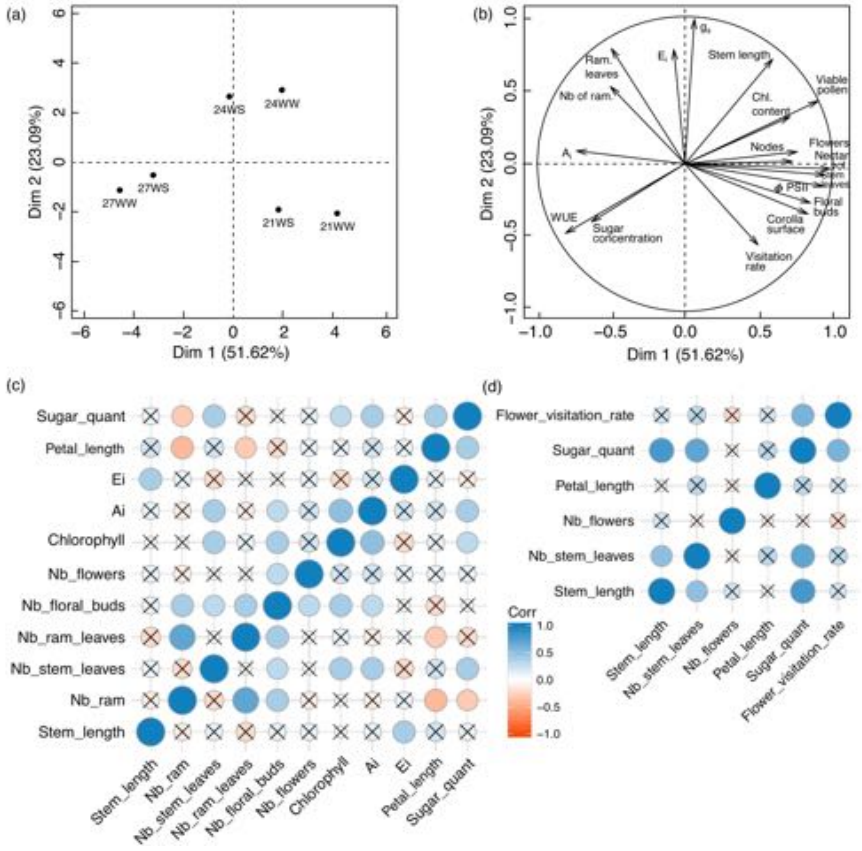


Fig. 4 Principal component analysis (PCA) (a-b) and correlation graphs (c-d) of vegetative, physiological, floral parameters and flower visitation rate in response to temperature rise (21, 24, and 27°C) and water stress treatments (WW, well-watered plants; WS, water-stressed plants). (a) Individual graph; (b) variable graph of PCA three weeks after stress induction. Correlations analyses five weeks after stress induction; (c) correlations between physiological, vegetative and floral parameters of all plants (N=60) and (d) correlations between vegetative, floral parameters and insect visitation of plants exposed to bumblebees (N=18) (A_i, instantaneous photosynthetic rate; Chl, chlorophyll; E_i, instantaneous transpiration rate; g_s, stomatal conductance; nb, number; ram, ramification; sugar_quant, nectar sugar quantity per flower; WUE, water use efficiency; ΦPSII, Photosystem II efficiency). Non significant correlations (P<0.05) are marked with a cross.

4. Discussion

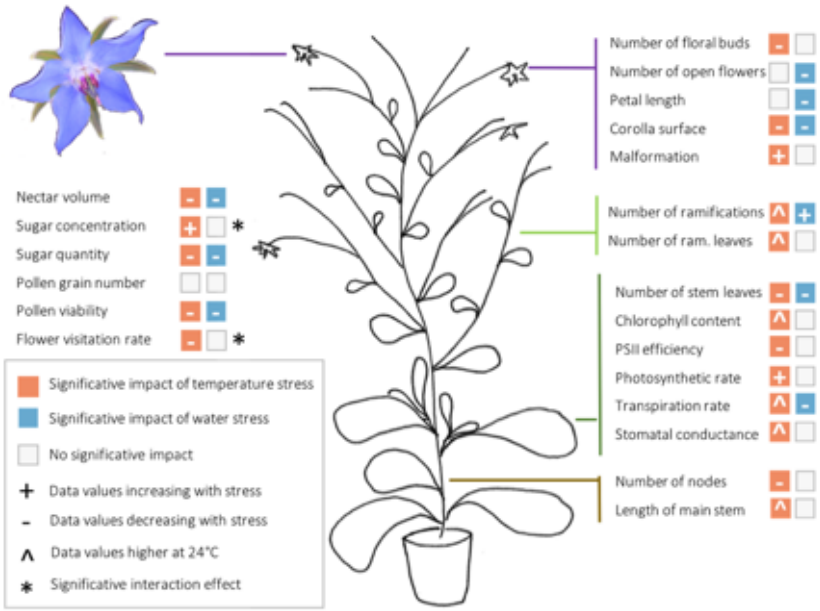


Fig. 5 Impact of temperature and water stresses on *B. officinalis* plant functions.

4.1. Do temperature and water stress interact in their effect on plant functions?

Our results showed that both temperature increase and water stress affected *B. officinalis* growth, development and physiology (Fig. 5). Vegetative traits and plant physiology were more affected by temperature while reproductive growth and floral rewards were affected by both temperature increase and water stress. In *B. officinalis*, the effects of temperature rise and water stress were generally additive as observed for the number of leaves on the main stem, the corolla surface, the nectar production and the pollen viability. Specific interactions were only observed for the sugar concentration in nectar and the flower visitation rate. The interactions between temperature and water stress were reported to be additive in several plant species and the combination of both stresses could have a stronger effect on plants than each stress alone depending on the observed parameter (Barnabás et al., 2008; Pandey et al., 2015). However, the combination of temperature and water stresses can also alter plant functions in different ways compared with single stress and have specific effect as observed by Rizhsky et al. (2002) in tobacco.

According to Pandey et al. (2015), both stresses lead to a reduction in photosynthesis. Photosynthesis-related parameters were mainly affected by temperature during our experiment. Increased temperature influenced light-dependent photosynthetic reactions more than light-independent reactions. In our experiment, chlorophyll content and

ΦPSII decreased with temperature. Temperature may impair photosynthetic electron transport rate or PSII integrity (Prasad et al., 2008). Temperature rise has been previously shown to negatively affect the light-dependent phase of photosynthesis (Prasad et al., 2008). However, the light-independent phase of photosynthesis seemed undisturbed in our experiment; we observed an increase in net photosynthesis with temperature. Stomata remained open under high temperature, allowing gas exchange. E_i, as well as g_s, was even higher at 24°C compared to the other temperatures, suggesting that the plant was not stressed at 24°C. WUE increased with temperature, showing that *B. officinalis* deployed mechanisms to cope with high temperatures and limited water loss without reducing photosynthesis. A similar increase in WUE was observed in plants adapted to high temperatures (Tambussi et al., 2007).

Water stress influenced photosynthesis through plant water status. We observed that *B. officinalis* decreased E_i and g_s under water stress. A decrease in E_i is a common response to water stress; plants close their stomata to limit water loss (Qaderi et al., 2012; Lambrecht et al., 2017). Decreasing g_s usually reduces plant photosynthesis (Adejare & Umebese, 2007; Khan et al., 2010). Nevertheless, we observed that the net photosynthetic rate was only slightly affected by water stress in our experiment due to an increase in intrinsic WUE. High WUE has been reported as a strategy to increase resource use efficiency in several species (Gomes et al., 2009; Quinet et al., 2015; Lambrecht et al., 2017).

Regarding vegetative development, plant growth was stimulated at 24°C compared to 21°C in *B. officinalis*. Indeed, the length of main stem, the total leaf number, and the ramification length were higher at 24°C compared to the other temperatures. These results suggest that optimum growth temperature was around 24°C for *B. officinalis*. The higher value of several vegetative traits at 24°C could be related to increased gas exchanges and chlorophyll content observed at this temperature. It is well known that photosynthesis activity is correlated with the chlorophyll content (Fleischer, 1935; Croft et al., 2017) and determine the carbon fixation which will be used for vegetative and reproductive growth (Poorter et al., 2013). However, plant growth was impaired at 27°C, with smaller plants and less nodes and leaves on the main stem. Temperature above optimum decreased plant growth in *B. officinalis*, as observed by Qaderi et al. (2012) for *Brassica napus*. The light phase of photosynthesis was affected at 27°C, which could result in a decrease in photosynthesis and sugar production and ultimately in a growth reduction. The CO_2 import was not affected but we did not investigate the Rubisco activity neither the sugar production in our study. Salvucci & Crafts-Brandner (2004) reported that heat stress can inactivate Rubisco in heat-sensitive plant species and the carboxylation phase has indeed been reported to be particularly temperature sensitive in several plants (Salvucci & Crafts-Brandner, 2004 ; Ashraf & Harris, 2013).

Both temperature rise and water stress modified plant architecture, increasing ramification development in *B. officinalis*. Such axillary development was previously reported in response to abiotic constraints (Mathieu et al., 2014; Boutraa & Sanders,

2001) and could be explained by a release of apical dominance. Release of apical dominance is associated with floral transition (Bernier et al., 1981) and our experiment started just at this growth stage. Leaves on the main stem were almost fully developed before the start of the experiment, while leaves on ramifications were initiated during the experiment. During ramification, new leaves were initiated and, simultaneously, leaf senescence was observed on the main stem, primarily under water stress. Leaf senescence is a common response to water stress (Connor & Jones, 1985; Prasad et al., 2008), while temperature can stimulate leaf production up to a species-specific optimum temperature (Gray & Brady, 2016). We observed that leaf development on ramifications was higher at 24°C than at 21°C or 27°C. The combination of temperature rise and water stress was detrimental to plants above the optimum temperature, in our case, 27°C. Vile et al. (2012) and Prasad et al. (2008) also reported that a combination of high temperature and water stress reduced plant growth and increased leaf senescence, as compared to a single stress.

Regarding reproductive development, high temperatures decreased the number of flower buds while water stress increased flower abortion, resulting in a low number of open flowers. High temperatures (above 27°C) have been previously shown to cause a reduction in flower number for three *Brassica* species (Morrison & Stewart, 2002) and water stress increased flower abortion in several species (Guo et al., 2013; Smith & Zao, 2016). Kay & Picklum (2013) showed also a lower flower production in drought conditions compared to well-watered conditions for two *Clarkia* species. Both stresses also affected the flower size, pollen viability and nectar production in *B. officinalis*. Flower size reduction was previously reported in response to drought. Caroll et al. (2001) observed a reduction of 33% in flower size after 12 days of drought for *Epilobium angustifolium*, and Lambrechts et al. (2017) reported a decrease in flower size of *Leptosiphon androsaceus* in response to dry years. The high water costs of flowering influence flower morphology (De la Barrera & Nobel, 2004). Low pollen viability and male sterility are also common defects in response to both temperature rise and water stress (Erickson & Markhart, 2002; Prasad et al., 2008; Su et al., 2013; Mesihovic et al., 2016; Smith & Zhao, 2016). Temperature rise and water stress applied during flower morphogenesis particularly affect pollen development, causing abnormalities (Barnabás et al., 2008; Zinn et al., 2010; Hedhly, 2011; Snider & Oosterhuis, 2011). The consequence of temperature rise and water stress on pollen quality will depend on stress intensity and plant species. Sato et al. (2006) observed that under moderate temperature rise (+ 4°C), pollen production of *Lycopersicon esculentum* was not affected even if pollen viability was reduced (20% compared to 85% for control plants). Under water stress, Su et al. (2013) observed also abnormal anther development and low pollen viability. We observed a reduction of nectar production in response to both stresses in *B. officinalis*. Several studies showed that floral rewards are affected by temperature and water availability. In *Epilobium angustifolium*, Carroll et al. (2001) observed a 60% reduction in nectar volume after 12 days of water stress. Mu et al. (2015) found a 60% reduction of nectar volume for *Saussurea nigrescens* after experimental warming (maximum + 3°C compared to annual mean temperature). A high night temperature can cause a nectar volume decline by increasing the nocturnal plant respiration and the carbohydrates depleting, which would be otherwise allocated to

nectar production (Mu et al., 2015). However, in both cases, the sugar concentration was not altered (Carroll et al., 2001; Mu et al., 2015). On the contrary, in our study, the combination of both stresses had a specific effect on sugar concentration since water stress tended to increase the sugar concentration at low temperature and to decrease it at high temperature. In any event, both stresses had additive effects on the total sugar content in nectar per flower, so that the amount of sugar available per flower decreased with the stress intensity.

4.2. Do temperature and water stress influence floral traits and floral rewards directly or indirectly?

Floral parameters and floral rewards were affected by both stresses in our experiment. Even if plants maintained growth and physiological status, abiotic stresses had consequences on flower production and development. Reproductive stage is particularly sensitive to abiotic constraints in several species (Prasad et al., 2015; Sage et al., 2015; Korres et al., 2016). The effects of abiotic stresses on plant reproduction could be mediated by modifications of plant physiology and vegetative traits but also due to direct effects on flowering and flower development processes.

Our results showed that the number of flower buds and the nectar production were positively correlated with the vegetative development of the main stem and some photosynthesis parameters. Part of the carbohydrates produced by source leaves through photosynthesis could be available for export via the phloem to sink organs such as flowers (Lemoine et al., 2013). According to many studies, up to 80% of photosynthetic fixed carbon can be exported by mature leaves (Lemoine et al., 2013). Restriction in resources could thus lead to a decrease in flower production and to flower abortion. Abortion of floral buds is common when abiotic stresses are applied just before or during anthesis (Prasad et al., 2008; Vile et al., 2012). Regarding nectar production, floral nectaries store large quantity of starch before anthesis which is rapidly converted into sucrose at anthesis for nectar secretion (Roy et al., 2017). Thus, a decrease of carbohydrate production or starch transport will limit nectar content. It was reported that drought can induce phloem transport failure affecting access to carbohydrate reserve (Sevanto et al., 2014). Moreover, Lemoine et al. (2013) reported that the balance between source and sink organs is particularly sensitive to abiotic stress during reproductive development, so that carbohydrates could be reallocated between source and sink organs. The plant may indeed be regarded as a series of sources and sinks with an overall carbon fixation capacity and several sinks " competing" for the available assimilates (Lemoine et al., 2013). This creates a priority system among sinks, and ramification development could be a major sink as compared with flower development in our experiment. The petal length and the nectar sugar content were indeed negatively correlated with the development of ramifications, confirming the competition between the vegetative and reproductive development in the context of abiotic stress. The reduction of the reproductive development we observed could thus be partly viewed as an indirect effet

of abiotic stress through modifications of photosynthesis, production of assimilates and assimilate partitioning between sink organs.

However, reproductive stage is often reported as more sensitive than vegetative traits to abiotic constraints (Zinn et al., 2010; Hedhly, 2011; Snider & Oosterhuis, 2011). Temperature rise and water stress could have more specific effects during this developmental stage. We observed that plant growth was stimulated at 24°C while reproductive development was already impaired at this temperature. The optimum range of temperature for reproduction is lower than for vegetative growth in several species (Prasad et al., 2015; Korres et al., 2016). Flower morphogenesis was also affected as temperature rise induced floral organ malformations in our experiment. The number of floral organs was modified; for example, flowers developed with only three or four petals. It has been reported that abiotic stresses can reduce the number and the size of floral organs and cause flower deformity or sterility due to altered expression of genes involved in flower morphogenesis (Zinn et al., 2010; Smith & Zhao, 2016). Sterility is induced by abiotic stresses mostly in male floral organ development (Barnabás et al., 2008; Zinn et al., 2010; Hedhly, 2011; Snider & Oosterhuis, 2011; Smith & Zhao, 2016). We observed increasing pollen grain abnormalities with temperature rise and water stress, decreasing the number of mature pollen grains. Defects appear particularly during meiosis, tapetum development, anthesis, dehiscence, and fertilization (Smith & Zhao, 2016). These modifications can alter the chemical composition of pollen, a parameter that modulates plant-pollinator interactions (Muth et al., 2016) and plant reproductive success (Zinn et al., 2010). The female organs are generally not as susceptible as the male organs to abiotic stresses (Smith & Zhao, 2016) but female gametophyte fertility and seed development could be affected by abiotic stress (Hedlhy, 2011; Su et al., 2013). Heat and drought stresses reduced the sexual organ fertility and the floral rewards content in our study but the final impact on reproductive success needs further investigations.

4.3. Do these stresses modify flower visitation by insects?

Overall, we observed that stressed flowers were less visited than non-stressed flowers. Insects visited mainly flowers for nectar and pollen collection (Nicolson, 2011) and modifications in floral rewards may explain the observed visitation rates. As previously mentioned, floral rewards were impacted by the temperature and water stresses. The visitation rate was positively correlated with the nectar production in *B. officinalis*. Without stress, flowers produced a high nectar sugar quantity (3.9 mg/flower) and were more visited compared to flowers under temperature and water stress, which produced a lower nectar sugar quantity (1.3 mg/flower). Bees can modify their foraging behaviour in response to nectar modification, bees visited more flowers on plants that produced higher nectar quantity than others (Chittka et al., 1997; Blarer et al., 2002; Cartar, 2004; Dreisig, 2012). However, at 27°C, we observed a higher visitation rate for plants under water stress compared to well watered plants. One could hypothesise that the low nectar volume led insects to visit more flowers on the same plant to collect a minimum volume of nectar. The sugar concentration in nectar was about 60% at 27°C and it is known that

bumblebees discriminate between small differences in nectar concentration and prefer sugar concentrations higher than 40 % (Cnaani et al., 2006). Even under stress conditions, the nectar production of *B. officinalis* was similar or higher as compared with other attractive bee-pollinated species (Baude et al., 2016; Somme et al., 2016), suggesting that *B. officinalis* remains an interesting nectar source wathever the environmental conditions.

In addition to nectar, pollen amount and quality also affect pollinator foraging behaviour (Cook et al., 2003). Although the amount of pollen per flower was not affected in our study, the pollen viability decreased with the stress intensity. Pollen of low viability has most probably also a lower quality for insects (Muth et al., 2016). The pollen viability may thus also explain the flower visitation in our experiment. Likewise, without stress, flowers produced pollen with high viability compared to stressed flowers, mainly at 27°C, which produced pollen with low viability. The effects of temperature and water stress on chemical composition of pollen need further investigations. Indeed, pollen chemical composition influence bee visitation behavior (Cook et al., 2003; Somme et al., 2014; Vanderplanck et al., 2014; Muth et al., 2016). The relative contribution of nectar and pollen to explain the decrease of visitation rate remains to be studied.

The floral rewards are not the only parameters that drive the flower visitation by insects and other floral traits are linked to flower attractiveness (Fowler et al., 2016). Temperature and water stresses affected other parameters such as floral morphology. Firstly, we observed that stressed flowers had a reduced size eventhough this parameter was not correlated with flower visitation in our experiment. On the contrary, Stanton & Preston (1988) showed that flower size was correlated with pollinator visitation in *Raphanus sativus*. Secondly, we observed flowers with meristic or homeotic modifications of the floral organs. Modifications such as abnormal stamen or nectary development impair floral-reward accessibility. Modifications of floral morphology could alter pollinator choice, leading to patch abandonment (Chittka et al., 1999). The impact of floral morphology on *B. officinalis* pollination will be further investigated.

In conclusion, we observed that although *B. officinalis* growth and development were more affected by temperature rise than water stress, both stresses had mainly additive effects. Despite *B. officinalis* developed physiological mechanisms that limit the negative impact of these abiotic stresses, floral traits and flower rewards were substantially altered by these stresses, compromising pollinator attractiveness and potentially plant reproductive success.

Acknowledgments

We thank C. Buyens, E. Descamps and S. Françoisse for technical assistance. We are grateful to G.R.P.V. laboratory (Groupe de Recherche en Physiologie Végétale, S. Lutts) for lending measuring instruments for physiological parameters. Thank to Jennifer Mach for language improvement and the two anonymous reviewers for their valuable

comments on the first version of the manuscript. This work is a part of a Ph.D. (C. Descamps) and master thesis of Aurélie Baijot. There is no conflict of interest.

Author contribution

C. Descamps, M. Quinet and A.-L. Jacquemart designed the experiments. C. Descamps, M. Quinet, A. Baijot performed field and laboratory experiments. M. Quinet and A.-L. Jacquemart supervised the study. C. Descamps, M. Quinet wrote the manuscript. All authors revised the draft manuscript and read and approved the final manuscript.

5. References

Adejare, F. B., & Umebese, C. E. (2007). Stomatal resistance to low leaf water potential at different growth stages affects plant biomass in *Glycine max* L. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, *2*(3), 136-141. doi:10.3844/ajabssp.2007.136.141

Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, *51*(2), 163–190. doi:10.1007/s11099-013-0021-6

Bailes, E. J., Ollerton, J., Pattrick, J. G., & Glover, B. J. (2015). How can an understanding of plant–pollinator interactions contribute to global food security? *Current Opinion in Plant Biology*, *26*, 72–79. doi:10.1016/j.pbi.2015.06.002

Barnabás, B., Jäger, K., & Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment*, *31*(1), 11–38. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x

Bartomeus, I., Ascher, J. S., Wagner, D., Danforth, B. N., Colla, S., Kornbluth, S., & Winfree, R. (2011). Climate-associated phenological advances in bee pollinators and bee-pollinated plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(51), 20645–20649. doi:10.1073/pnas.1115559108

Baude, M., Kunin, W., Boatman, N., Conyers, S., Davies, N., Gillespie, M., Morton, R., Smart, S., & Memmott, J. (2016). Historical nectar assessment reveals the fall and rise of floral resources in Britain. *Nature*, *530*(7588), 85. doi :10.1038/nature16532

Berger, J., Palta, J., & Vadez, V. (2016). Review: an integrated framework for crop adaptation to dry environments: responses to transient and terminal drought. *Plant Science*, *253*, 58–67. doi:10.1016/j.plantsci.2016.09.007

Bernier, G., Kinet, J.-M., & Sachs, R. M. (1981). *The physiology of flowering* (Vol. 1). CRC press Boca Raton, FL, USA. doi:10.1146/annurev.pp.03.060152.001405

Bishop, J., Potts, S. G., & Jones, H. E. (2016). Susceptibility of faba bean (*Vicia faba* L.) to heat stress during floral development and anthesis. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *202*(6), 508–517. doi:10.1111/jac.12172

Blarer, A., Keasar, T., & Shmida, A. (2002). Possible mechanisms for the formation of flower size preferences by foraging bumblebees. *Ethology*, 108(4), 341–351. doi:10.1046/j.1439-0310.2002.00778.x

Boutraa, T., & Sanders, F. E. (2001). Influence of water stress on grain yield and vegetative growth of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, *187*(4), 251–257. doi:10.1046/j.1439-037X.2001.00525.x

Cane, J. H. (2016). Adult pollen diet essential for egg maturation by a solitary *Osmia* bee. *Journal of Insect Physiology*, *95*, 105–109. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.09.011

Carroll, A. B., Pallardy, S. G., & Galen, C. (2001). Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany*, *88*(3), 438–446. doi:10.2307/2657108

Cartar, R. V. (2004). Resource tracking by bumble bees: responses to plant-level differences in quality. *Ecology*, *85*(10), 2764–2771. doi:10.1890/03-0484

Chittka, L., Gumbert, A., & Kunze, J. (1997). Foraging dynamics of bumble bees: correlates of movements within and between plant species. *Behavioral Ecology*, 8(3), 239–249. doi:10.1093/beheco/8.3.239

Chittka, L., Thomson, J. D., & Waser, N. M. (1999). Flower constancy, insect psychology and plant evolution. *Naturwissenschaften*, 86(8), 361–377. doi:10.1007/s001140050636

Cnaani, J., Thomson, J. D., & Papaj, D. R. (2006). Flower choice and learning in foraging bumblebees: effects of variation in nectar volume and concentration. *Ethology*, *112*(3), 278–285. doi:10.1111/j.1439-0310.2006.01174.x

Connor, D. J., & Jones, T. R. (1985). Response of sunflower to strategies of irrigation. II. Morphological and physiological responses to water stress. *Field Crops Research*, *12*, 91–103. doi:10.1016/0378-4290(85)90056-5

Cook, S. M., Awmack, C. S., Murray, D. A., & Williams, I. H. (2003). Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology*, *28*(5), 622–627. doi:10.1046/j.1365-2311.2003.00548.x

Croft, H., Chen, J. M., Luo, X., Bartlett, P., Chen, B., & Staebler, R. M. (2017). Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology*, *23*(9), 3513–3524. doi :10.1111/gcb.13599

Dafni, A., Kevan, P. G., & Husband, B. C. (2005). Practical pollination biology. *Enviroquest Ltd.,* Cambridge, Canada.

De la Barrera, E., & Nobel, P. S. (2004). Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in Plant Science*, *9*(2), 65–69. doi :10.1016/j.tplants.2003.12.003

Devasirvatham, V., Gaur, P. M., Mallikarjuna, N., Tokachichu, R. N., Trethowan, R. M., & Tan, D. K. Y. (2012). Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments. *Functional Plant Biology*, *39*(12), 1009–1018. doi:10.1071/FP12033

Dreisig, H. (2012). How long to stay on a plant: the response of bumblebees to encountered nectar levels. *Arthropod-Plant Interactions*, *6*(2), 315–325. doi:10.1007/s11829-011-9169-9

Erickson, A. N., & Markhart, A. H. (2002). Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell & Environment*, *25*(1), 123–130. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00807.x

Fleischer, W. E. (1935). The relation between chlorophyll content and rate of photosynthesis. *The Journal of General Physiology*, *18*(4), 573–597. doi :10.1085/jgp.18.4.573

Forrest, J. R. K. (2017). Insect pollinators and climate change. In *Global Climate Change and Terrestrial Invertebrates* (pp. 71–91). doi:10.1002/9781119070894.ch5

Fowler, R. E., Rotheray, E. L., & Goulson, D. (2016). Floral abundance and resource quality influence pollinator choice. *Insect Conservation and Diversity*, *9*(6), 481–494. doi:10.1111/icad.12197

Gomes, F. P., Oliva, M. A., Mielke, M. S., Almeida, A. F. D., Leite, H. G., & Aquino, L. A. (2009). Is abscisic acid involved in the drought responses of brazilian green dwarf coconut? *Experimental Agriculture*, *45*(2), 189–198. doi:10.1017/S0014479708007436

González-Varo, J. P., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Potts, S. G., Schweiger, O., Smith, H. G., Steffan-Dewenter, I., Szentgyörgyi, I., Woyciechowski, M., & Vilà, M. (2013). Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology & Evolution*, *28*(9), 524–530. doi:10.1016/j.tree.2013.05.008

Gray, S. B., & Brady, S. M. (2016). Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology*, *419*(1), 64–77. doi:10.1016/j.ydbio.2016.07.023

Guo, Y. M., Chen, S., Nelson, M. N., Cowling, W., & Turner, N. C. (2013). Delayed water loss and temperature rise in floral buds compared with leaves of *Brassica rapa* subjected to a transient water stress during reproductive development. *Functional Plant Biology*, *40*(7), 690–699. doi :10.1071/FP12335

Hanley, M. E., Franco, M., Pichon, S., Darvill, B., & Goulson, D. (2008). Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants. *Functional Ecology*, *22*(4), 592–598. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01415.x

Hedhly, A. (2011). Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany*, *74*, 9–16. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.03.016

Hegland, S. J., Nielsen, A., Lázaro, A., Bjerknes, A.-L., & Totland, Ø. (2009). How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecology Letters*, *12*(2), 184–195. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01269.x

IPCC. (2014). Climate Change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland.

Kay, K. & Picklum, D. (2013). Drought alters the expression of mating system traits in two species of *Clarkia*. *Evolutionary Ecology, 27*(5), 899-910. doi: 10.1007/s10682-013-9630-6

Khan, H. R., Paull, J. G., Siddique, K. H. M., & Stoddard, F. L. (2010). Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crops Research*, *115*(3), 279–286. doi:10.1016/j.fcr.2009.09.003

Korres, N. E., Norsworthy, J. K., Tehranchian, P., Gitsopoulos, T. K., Loka, D. A., Oosterhuis, D. M., Gealy, D., Moss, S., Burgos, N., Miller, M., & Palhano, M. (2016). Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, *36*(1), 12. doi :10.1007/s13593-016-0350-5

Koti, S., Reddy, K. R., Reddy, V. R., Kakani, V. G., & Zhao, D. (2005). Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. *Journal of Experimental Botany*, *56*(412), 725–736. doi:10.1093/jxb/eri044

Kudo, G., & Harder, L. D. (2005). Floral and inflorescence effects on variation in pollen removal and seed production among six legume species. *Functional Ecology*, *19*(2), 245–254. doi:10.1111/j.1365-2435.2005.00961.x

Lambrecht, S. C., Morrow, A., & Hussey, R. (2017). Variation in and adaptive plasticity of flower size and drought-coping traits. *Plant Ecology*, *218*(6), 647–660. doi :10.1007/s11258-017-0718-x

Larsson, M., & Franzén, M. (2007). Critical resource levels of pollen for the declining bee *Andrena hattorfiana* (Hymenoptera, Andrenidae). *Biological Conservation*, *134*(3), 405–414. doi:10.1016/j.biocon.2006.08.030

Lemoine, R., Camera, S. L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J. & Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, *4*. doi:10.3389/fpls.2013.00272

Mathieu, A.-S., Lutts, S., Vandoorne, B., Descamps, C., Périlleux, C., Dielen, V., Van Herck, J.C., & Quinet, M. (2014). High temperatures limit plant growth but hasten flowering in root chicory (*Cichorium intybus*) independently of vernalisation. *Journal of Plant Physiology*, *171*(2), 109–118. doi:10.1016/j.jplph.2013.09.011

Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, *51*(345), 659–668. doi:10.1093/jexbot/51.345.659

Mesihovic, A., Iannacone, R., Firon, N., & Fragkostefanakis, S. (2016). Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant Reproduction*, *29*(1), 93–105. doi:10.1007/s00497-016-0281-y

Morrison, M. J., & Stewart, D. W. (2002). Heat stress during flowering in summer *Brassica*. *Crop Science*, *42*(3), 797–803. doi:10.2135/cropsci2002.7970

Mu, J., Peng, Y., Xi, X., Wu, X., Li, G., Niklas, K. J., & Sun, S. (2015). Artificial asymmetric warming reduces nectar yield in a Tibetan alpine species of Asteraceae. *Annals of Botany*, *116*(6), 899–906. doi:10.1093/aob/mcv042

Muhl, Q. E., Toit, E. S. du, Steyn, J. M., & Apostolides, Z. (2013). Bud development, flowering and fruit set of *Moringa oleifera* Lam. (Horseradish Tree) as affected by various irrigation levels. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics (JARTS)*, *114*(2), 79–87.

Muth, F., Francis, J. S., & Leonard, A. S. (2016). Bees use the taste of pollen to determine which flowers to visit. *Biology Letters*, 12(7), 20160356. doi:10.1098/rsbl.2016.0356

Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, *46*(2), 197–204. doi:10.1080/15627020.2011.11407495

Nicolson, S.W. & Susan, W. (2007). Nectar consumers. In *Nectaries and nectar* (pp. 289–342). Springer, Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-5937-7_7

Nicolson, S. W., & Thornburg, R. W. (2007). Nectar chemistry. In *Nectaries and nectar* (pp. 215–264). Springer, Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-5937-7_5

Pandey, P., Ramegowda, V., & Senthil-Kumar, M. (2015). Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *6*. doi:10.3389/fpls.2015.00723

Parmesan, C., & Hanley, M. E. (2015). Plants and climate change: complexities and surprises. *Annals of Botany*, *116*(6), 849–864. doi:10.1093/aob/mcv169

Pincebourde, S., van Baaren, J., Rasmann, S., Rasmont, P., Rodet, G., Martinet, B., & Calatayud, P.-A. (2016). Plant–insect interactions in a changing world. *Advances in Botanical Research*, 81, 289-332. doi:10.1016/bs.abr.2016.09.009

Poorter, H., Anten, N. P. R., & Marcelis, L. F. M. (2013). Physiological mechanisms in plant growth models: do we need a supra-cellular systems biology approach? *Plant, Cell & Environment*, *36*(9), 1673–1690. doi :10.1111/pce.12123

Potts, S. G., Vulliamy, B., Dafni, A., Ne'eman, G., & Willmer, P. (2003). Linking bees and flowers: how do floral communities structure pollinator communities? *Ecology*, *84*(10), 2628–2642. doi:10.1890/02-0136

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345–353.

Prasad, P. V. V., Staggenborg, S., & Ristic, Z. (2008). Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of crops to limited water: understanding and modeling water stress effects on plant growth processes*, *advances in agric*, 301–355. doi:10.2134/advagricsystmodel1.c11

Prasad, P. V. V., Djanaguiraman, M., Perumal, R., & Ciampitti, I. A. (2015). Impact of high temperature stress on floret fertility and individual grain weight of grain sorghum: sensitive stages and thresholds for temperature and duration. *Frontiers in Plant Science*, *6*. doi:10.3389/fpls.2015.00820

Prasch, C. M., & Sonnewald, U. (2015). Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environmental and Experimental Botany*, *114*, 4–14. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.06.020

Prys-Jones, O. E., & Corbet, S. A. (1991). Naturalists' Handbooks 6: Bumblebees. Slough: Richmond Publishing Co. Ltd.

Qaderi, M. M., Kurepin, L. V., & Reid, D. M. (2012). Effects of temperature and watering regime on growth, gas exchange and abscisic acid content of canola (*Brassica napus*) seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, *75*, 107–113. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.09.003

Quinet, M., Descamps, C., Coster, Q., Lutts, S., Jacquemart, A.-L. (2015). Tolerance to water stress and shade in the invasive *Impatiens parviflora*. *International Journal of Plant Sciences*, *176*(9), 848–858. doi:10.1086/683276

Rizhsky, L., Liang, H., & Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology*, *130*(3), 1143–1151. doi:10.1104/pp.006858

Roger, N., Michez, D., Wattiez, R., Sheridan, C., & Vanderplanck, M. (2016). Diet effects on bumblebee health. *Journal of Insect Physiology*, *96*, 128–133. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.11.002

Roger, N., Moerman, R., Carvalheiro, L. G., Aguirre-Guitiérrez, J., Jacquemart, A.-L., Kleijn, D., Lognay, G., Moquet, L., Quinet, M., Rasmont, P., Richel, A.,

Vanderplanck, M. & Michez, D. (2017). Impact of pollen resources drift on common bumblebees in NW Europe. *Global Change Biology*, *23*(1), 68–76. doi:10.1111/gcb.13373

Roulston, T. H., Cane, J. H., & Buchmann, S. L. (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs*, *70*(4), 617–643. doi:10.2307/2657188

Roy, R., Schmitt, A. J., Thomas, J. B., & Carter, C. J. (2017). Review: Nectar biology: From molecules to ecosystems. *Plant Science*, *262*, 148–164. doi:10.1016/j.plantsci.2017.04.012

Sage, T. L., Bagha, S., Lundsgaard-Nielsen, V., Branch, H. A., Sultmanis, S., & Sage, R. F. (2015). The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research*, *182*, 30–42. doi:10.1016/j.fcr.2015.06.011

Salvucci, M. E., & Crafts-Brandner, S. J. (2004). Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology*, *134*(4), 1460–1470. doi:10.1104/pp.103.038323

Sato, S., Kamiyama, M., Iwata, T., Makita, N., Furukawa, H., & Ikeda, H. (2006). Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon*

esculentum by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany*, *97*(5), 731–738. doi:10.1093/aob/mcl037

Scaven, V. L., & Rafferty, N. E. (2013). Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Current Zoology*, *59*(3), 418–426.

Schweiger, O., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Hickler, T., Hulme, P. E., Klotz, S., Kühn, I., Moora, M., Nielsen, A., Ohlemüller, R., Petanidou, T., Potts, S., Pyšek, P., Stout, J., Sykes, M., Tscheulin, T., Vilà, M., Walther, G., Westphal, C., Winter, M., Zobel, M., & Settele, J. (2010). Multiple stressors on biotic interactions: how climate change and alien species interact to affect pollination. *Biological Reviews*, *85*(4), 777–795. doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00125.x

Settele, J., Bishop, J., & Potts, S. G. (2016). Climate change impacts on pollination. *Nature Plants*, *2*, 16092. doi:10.1038/nplants.2016.92

Sevanto, S. (2014). Phloem transport and drought. *Journal of Experimental Botany*, *65*(7), 1751–1759. doi:10.1093/jxb/ert467

Smith, A. R., & Zhao, D. (2016). Sterility caused by floral organ degeneration and abiotic stresses in *Arabidopsis* and cereal grains. *Frontiers in Plant Science*, *7*. doi:10.3389/fpls.2016.01503

Snider, J. L., & Oosterhuis, D. M. (2011). How does timing, duration, and severity of heat stress influence pollen-pistil interactions in angiosperms? *Plant Signaling & Behavior*, *6*(7), 930–933. doi:10.4161/psb.6.7.15315

Somme, L., Vanderplanck, M., Michez, D., Lombaerde, I., Moerman, R., Wathelet, B., Wattiez, R., Lognay, G., & Jacquemart, A.-L. (2014). Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie*, *46* (1), 1–15. doi:10.1007/s13592-014-0307-0

Somme, L., Moquet, L., Quinet, M., Vanderplanck, M., Michez, D., Lognay, G., & Jacquemart, A.-L. (2016). Food in a row: urban trees offer valuable floral resources to pollinating insects. *Urban Ecosystems*, *19*(3), 1149–1161. doi :10.1007/s11252-016-0555-z

Stanton, M. L., & Preston, R. E. (1988). Ecological consequences and phenotypic correlates of petal size variation in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, *75*(4), 528–539. doi:10.2307/2444218

Su, Z., Ma, X., Guo, H., Sukiran, N. L., Guo, B., Assmann, S. M., & Ma, H. (2013). Flower development under drought stress: morphological and transcriptomic analyses

reveal acute responses and long-term acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *25*(10), 3785–3807. doi:10.1105/tpc.113.115428

Takkis, K., Tscheulin, T., Tsalkatis, P., & Petanidou, T. (2015). Climate change reduces nectar secretion in two common Mediterranean plants. *AoB Plants*, *7*, plv111. doi:10.1093/aobpla/plv111

Tambussi, E., Bort, J., & Araus, J. (2007). Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology*, *150*(3), 307–321. doi:10.1111/j.1744-7348.2007.00143.x

Thom, M. D., Eberle, C. A., Forcella, F., Gesch, R., Weyers, S., & Lundgren, J. G. (2016). Nectar production in oilseeds: Food for pollinators in an agricultural landscape. *Crop Science*, *56*(2), 727–739. doi:10.2135/cropsci2015.05.0322

Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathelet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PLoS ONE*, *9*(1), e86209. doi :10.1371/journal.pone.0086209

Vile, D., Pervent, M., Belluau, M., Vasseur, F., Bresson, J., Muller, B., Granier, C., & Simonneau, T. (2012). *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? *Plant, Cell & Environment*, *35*(4), 702–718. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02445.x

Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, *61*(3), 199–223. doi:10.1016/j.envexpbot.2007.05.011

Wallisdevries, M. F., Van Swaay, C. A. M., & Plate, C. L. (2012). Changes in nectar supply: a possible cause of widespread butterfly decline. *Current Zoology*, *58*(3), 384–391. doi:10.1093/czoolo/58.3.384

Zhao, Z., Lu, N., & Conner, J. K. (2016). Adaptive pattern of nectar volume within inflorescences: bumblebee foraging behavior and pollinator-mediated natural selection. *Scientific Reports*, *6*. doi:10.1038/srep34499

Zinn, K. E., Tunc-Ozdemir, M., & Harper, J. F. (2010). Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*, *61*(7), 1959–1968. doi:10.1093/jxb/erq053

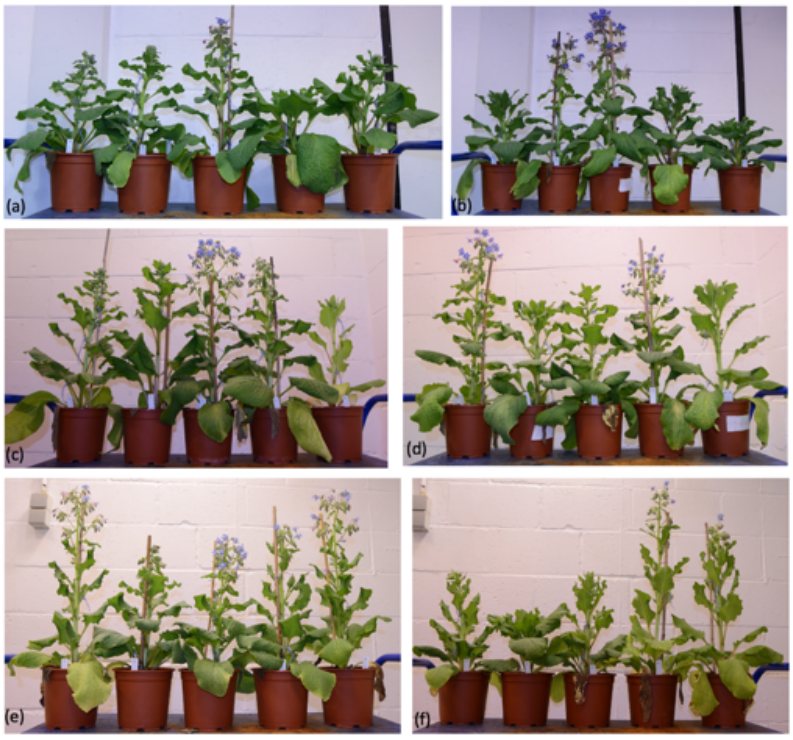


Figure II.6 : Plantes de *B. officinalis* par traitement dans les chambres de culture (phytotrons, plateforme SEFY, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgique) à la fin de la première semaine d'expérimentation : (a) 21WW, (b) 21WS, (c) 24WW, (d) 24WS, (e) 27WW, (f) 27WS. 21=21°C ; 24=24°C ; 27=27°C; WW = well-watered (arrosage régulier) ; WS = water-stressed (arrosage réduit, humidité du sol < 15%)

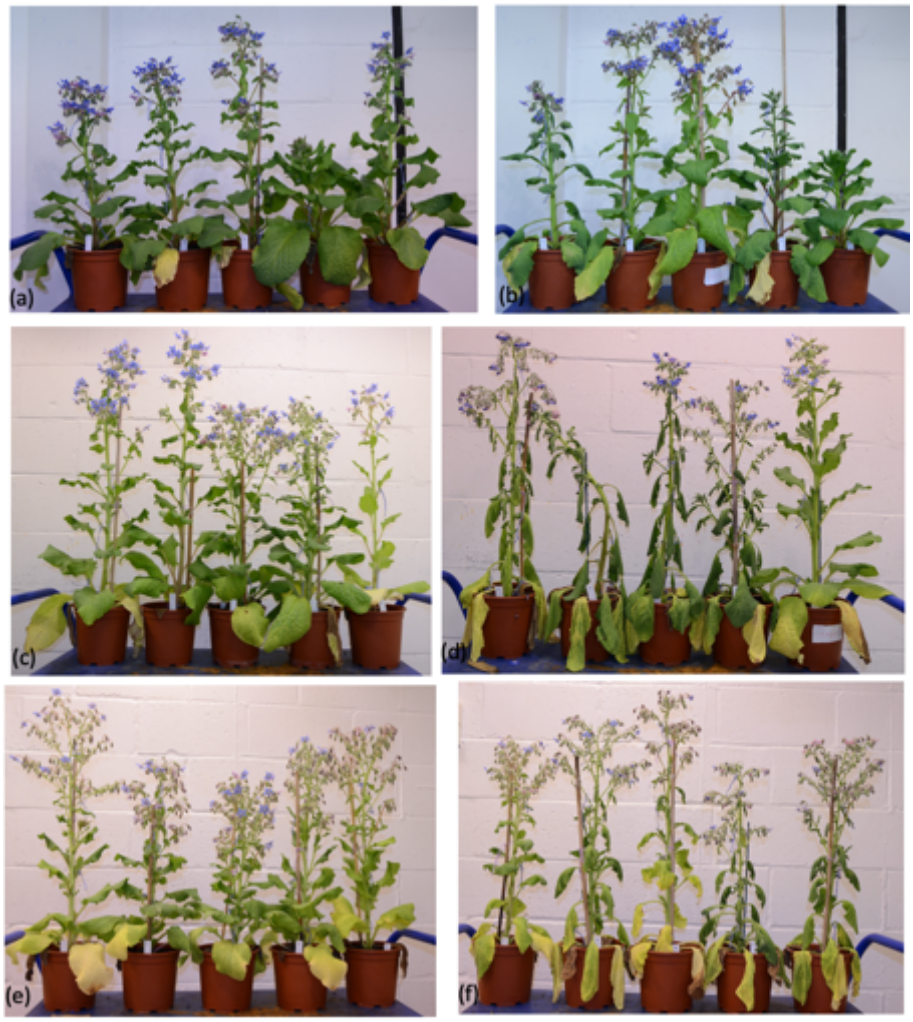


Figure II.7 : Plantes de *B. officinalis* par traitement dans les chambres de culture (phytotrons, plateforme SEFY, UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgique) durant la troisième semaine d'expérimentation : (a) 21WW, (b) 21WS, (c) 24WW, (d) 24WS, (e) 27WW, (f) 27WS. 21=21°C ; 24=24°C ; 27=27°C ; WW = well-watered (arrosage régulier) ; WS = water-stressed (arrosage réduit, humidité du sol < 15%)

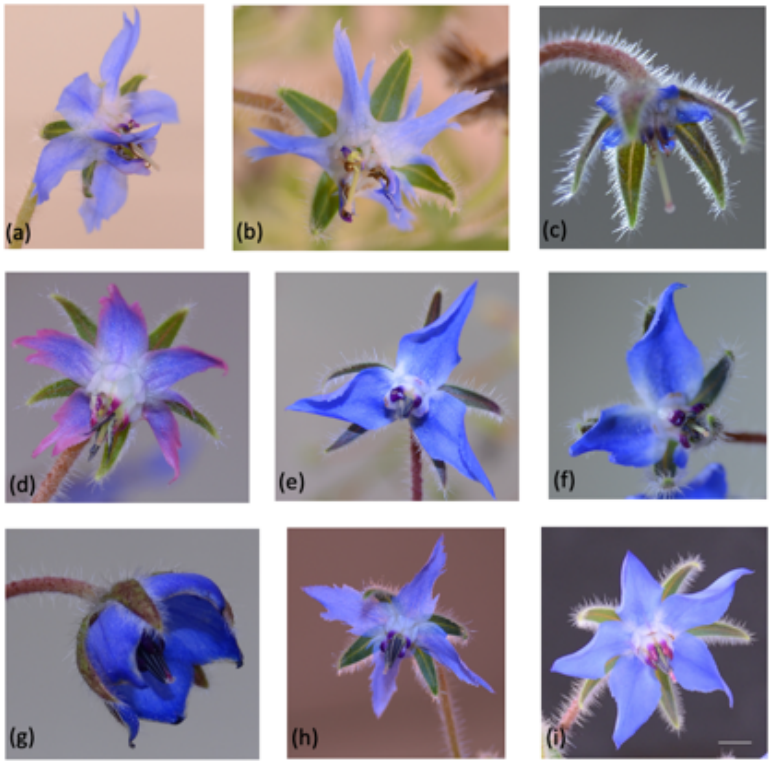


Figure II.8 : Fleurs de *B. officinalis* observées durant l'expérimentation dans les différents traitements à 24°C ou 27°C: (a-h) fleurs considérées comme malformées, (i) fleur considérée comme normalement formée. Barre d'échelle : 1 cm.

Chapter 3 : Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (*Echium*, Boraginaceae)

Ce chapitre 3 consacré à deux de nos 4 espèces modèles, *Echium plantagineum* (Fig. II.9) et *Echium vulgare* (Fig. II.10), décrit l'impact de la hausse de température et du stress hydrique sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux sur ces deux espèces. Ce chapitre a été publié.

Descamps, C, Marée, S, Hugon, S, Quinet, M, Jacquemart, A-L. (2020). Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (*Echium* , Boraginaceae). *Ecology and Evolution*. 00: 1– 13.
https://doi.org/10.1002/ece3.6389

Ce chapitre 3 explore la réponse de 2 autres espèces entomophiles de Boraginacées, *E. vulgare* et *E. plantagineum*. Ces deux espèces présentent une corolle tubulaire en entonnoir, ce qui les différencie de *B. officinalis* à corolle plane. Bien que les deux espèces appartiennent au même genre et présentent des caractéristiques morphologiques similaires, elles se distinguent essentiellement de par leur cycle de vie (annuelle vs bisannuelle). Ces expériences ont été aussi répétées en juin 2015 avec l'aide de Sophie Hugon (Master Bioingénieur) et juin 2016 avec l'aide de Sophie Marée (Master Bioingénieur). Nous avons suivi le protocole décrit en introduction de la partie II. Les conditions météorologiques défavorables deux années de suite ne nous ont pas permis de réaliser des suivis d'insectes visiteurs et pollinisateurs *in natura* comme cela a été fait dans le chapitre 2. Ces expériences nous ont dès lors permis d'obtenir des résultats concernant les deux premières questions de recherche (Fig. II.11). Notre hypothèse de départ était qu'un cycle de vie annuel serait un avantage pour faire face à une hausse de température et un stress hydrique, grâce à une plus grande plasticité phénotypique. Nous avons abordé 3 questions à savoir : i) Les réponses des deux plantes en termes de morphologie, physiologie, et traits floraux, sont-elles similaires ou dissemblables sous la sécheresse et le réchauffement ? ii) Quelle est l'implication de l'histoire de vie et des caractéristiques écologiques dans les réponses des deux espèces ? iii) Dans quelle mesure le stress combiné compromet-il l'attractivité florale pour les espèces annuelles et bisannuelles ?

Les apports de ce chapitre par rapport aux questions de recherche sont synthétisés ci-dessous.



Figure II.9 : Photos de *Echium plantagineum* : (a) plante entière (S. Marée, 2018) ; (b) inflorescence avec une fleur ouverte visitée par une syrphe (S. Marée, 2018)



Figure II.10 : Photos de *Echium vulgare* : (a) plante entière (S. Hugon, 2015) ; (b) inflorescence avec une fleur ouverte visitée par un lépidoptère (S. Hugon, 2015)

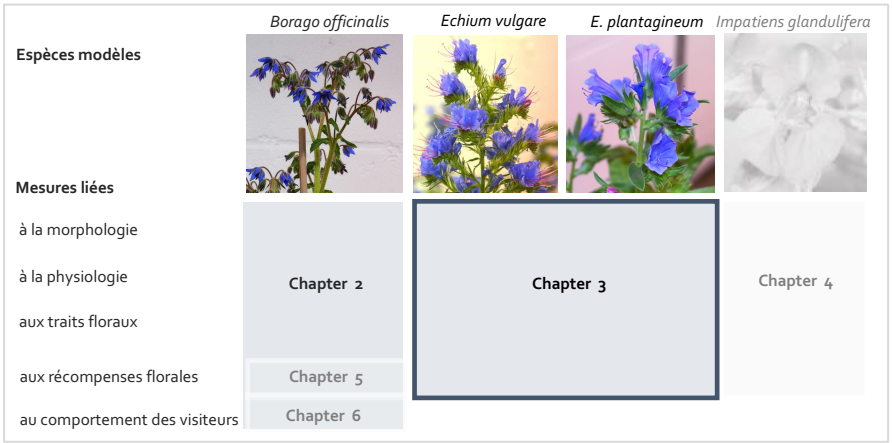


Figure II.11 : Schéma conceptuel de l'organisation des chapitres 2 à 6 de la thèse en fonction des thèmes explorés et des espèces modèles. L'encadré bleu correspond au chapitre d'intérêt.

1) Les impacts sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux

Le développement végétatif de *E. plantagineum* a été affecté négativement surtout par le stress hydrique, en réduisant le nombre de feuilles matures ainsi que sa croissance en hauteur (Fig. II. 12 en annexe). De manière similaire à *B. officinalis*, un développement de ramifications a été observé en réponse aux stress. La réponse de *E. vulgare* était différente et cette espèce a été affectée principalement par la hausse de température qui a eu pour effet de diminuer le nombre de feuilles. La hausse de température a principalement affecté la phase photochimique de la photosynthèse pour les deux espèces, en diminuant l'efficacité du photosystème II. Par contre, l'influence des stress sur l'efficience d'utilisation de l'eau chez les deux espèces a été opposé : tandis qu'elle augmentait en réponse au stress chez *E. plantagineum,* celle-ci diminuait chez *E. vulgare.* Concernant les traits floraux, tout comme chez *B. officinalis*, le stress hydrique a eu pour effet de diminuer le nombre de fleurs produites par plante de 22 à 45% suivant la hausse des températures. La surface de la corolle a aussi été nettement impactée, en particulier chez l'espèce annuelle, *E. plantagineum* (5.2 cm^2 à 21WW et 1.5 cm^2 à 27WS) par rapport à l'espèce bisannuelle, *E. vulgare* (2 cm^2 à 21WW et 1.2 cm^2 à 27WS, Fig. II. 13 en annexe). La longueur des étamines est également réduite par les deux stress pour les deux espèces.

2) Les impacts sur les quantités et composition des ressources florales

L'effet des stress sur la production de nectar a été contrasté : tandis que, chez *E. vulgare*, la production de nectar (volume, concentration en sucres, quantité de sucres par fleur) n'a pas été affecté, chez *E. plantagineum*, elle a été impactée négativement. Le volume de nectar a été réduit par les stress (environ 1.8 µl à 21WW et 0.2 µl à 27WS) ainsi que les quantités de sucres contenus dans le nectar par fleur (environ 0.6 mg par fleur à 21WW et 0.1 mg par fleur à 27WS). La viabilité du pollen n'a par contre pas été affectée par les stress chez *E. plantagineum*, allant de 30 à 50% suivant les traitements. Chez *E. vulgare,* seule la hausse de température a pu être évaluée et la viabilité maximum (80%) est observée à 24°C (comparativement à 21°C et 27°C où elle est de 60%).

Le chapitre 3 nous a permis d'observer que les réponses des espèces pouvaient différer bien qu'elles aient été soumises à des stress identiques et qu'elles appartiennent au même genre. Ces différences de réponses à la hausse de température et au stress hydrique ont été représentées grâce à l'analyse en composantes principales réalisées sur les variations relatives des paramètres par rapport au traitement « contrôle » 21WW (Fig. II. 14 en annexe). L'espèce *E. vulgare* semble moins affectée par les stress thermique et hydrique qu'*E. plantagineum*. Nous avons retenu l'hypothèse qu'un cycle de vie bisannuel permet à l'espèce ayant accumulé des réserves durant la première année de croissance de les réinvestir lorsque les ressources sont devenues limitantes suite aux stress durant la phase reproductive, ce qu'un cycle de vie annuel ne permet pas.

Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (*Echium*, Boraginaceae)

Charlotte Descamps, Sophie Marée, Sophie Hugon, Muriel Quinet, Anne-Laure Jacquemart

Earth and Life Institute– Agronomy, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Correspondence : Charlotte Descamps, email: charlotte.descamps@uclouvain.be

Descamps, C, Marée, S, Hugon, S, Quinet, M, Jacquemart, A-L. Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (*Echium* , Boraginaceae). *Ecology and Evolution*. 00: 1– 13. https://doi.org/10.1002/ece3.6389

Abstract

1. Water stress and increasing temperatures are two main constraints faced by plants in the context of climate change. These constraints affect plant physiology and morphology, including phenology, floral traits, and nectar rewards, thus altering plant–pollinator interactions.
2. We compared the abiotic stress responses of two bee-pollinated Boraginaceae species, *Echium plantagineum*, an annual, and *E. vulgare*, a biennial. Plants were grown for 5 weeks during their flowering period under two watering regimes (well-watered and water-stressed) and three temperature regimes (21, 24, 27°C).
3. We measured physiological traits linked to photosynthesis (chlorophyll content, stomatal conductance, and water use efficiency), and vegetative (leaf number and growth rate) and floral (e.g., flower number, phenology, floral morphology, and nectar production) traits.
4. The physiological and morphological traits of both species were affected by the water and temperature stresses, although the effects were greater for the annual species. Both stresses negatively affected floral traits, accelerating flower phenology, decreasing flower size, and, for the annual species, decreasing nectar rewards. In both species, the number of flowers was reduced by 22–45% under water stress, limiting the total amount of floral rewards.
5. Under water stress and increasing temperatures, which mimic the effects of climate change, floral traits and resources of bee-pollinated species are affected and can lead to disruptions of pollination and reproductive success.

Keywords : abiotic stress, bee-pollinated species, floral traits, nectar, flowers, increasing temperatures, water stress

1. Introduction

Drought and above optimal temperatures impair plant growth and development (Lamaoui *et al.* 2018), causing more damage in combination than they do individually (Mittler 2006; Orians *et al.* 2019; Pandey *et al.* 2015). The frequency of these abiotic stresses increases in the context of climate change (IPCC 2018). Both stresses affect vegetative and reproductive morphology, physiology, and development (Mittler 2006; Prieto *et al.* 2008; Rizhsky *et al.* 2004; Zandalinas *et al.* 2018). In temperate areas, the majority (78%, Ollerton *et al.* 2011) of wild and crop plant species depend on insects for their pollination. Floral attractiveness and visitation rates are presumed to be altered by abiotic stresses linked to climate change, leading to decreased pollination and reproductive success (Borghi *et al.* 2019; Cohen *et al.* 2018; Forrest 2016; Thomson 2016; Walter 2018).

The reduced water uptake associated with water stress disrupts plant metabolism. Photosynthesis and physiological processes are affected by water stress, which also reduces leaf number and stomatal conductance, and/or induces stomatal closure (Mittler 2006). However, metabolic rates increase with increasing temperatures, up to the optimal temperature for a given plant species. Higher temperatures enhance photosynthesis by increasing stomatal conductance (Zandalinas *et al.* 2018). However, when increasing temperatures and water stress are combined, photosynthetic activity declines for several reasons, including decreased Rubisco activity (Awasthi *et al.* 2014), damage to photosystem II (Devasirvatham *et al.* 2016), and increased respiration rate and high leaf temperature (Mittler 2006). The decreased photosynthetic activity, in turn, reduces the available resources for flower development and reproduction.

Water and temperature stresses are particularly deleterious when they occur early during the reproductive phase and during the blooming period (Barnabás *et al.* 2008; Scheepens *et al.* 2018). The number and size of flowers decrease under water and temperature stresses (Carroll *et al.* 2001; Descamps *et al.* 2018; Glenny *et al.* 2018; Phillips *et al.* 2018; Takkis *et al.* 2018). Nectar resources are generally reduced under these conditions, mainly because nectar volume decreases; even when the nectar sugar concentration rises, the total nectar sugar production declines (Carroll *et al.* 2001; Descamps *et al.* 2018; Phillips *et al.* 2018; Takkis *et al.* 2018). Despite the consequences for food production and wild species survival, studies on floral biology under combined abiotic stresses for bee-pollinated species are rare.

Our study focused on floral biology modifications to predict the attractiveness of entomophilous plant species under abiotic stresses. We choose two bee-pollinated, Boraginaceae species : *Echium plantagineum,* an annual, and *E. vulgare*, a biennial. Both species flowered for at least five weeks and produced more than 300 flowers per plant with large amounts of nectar (more than 0.3 mg of sugar per flower), allowing us to easily measure changes in floral biology. To understand the whole-plant coordinated responses, we compared the physiology, vegetative and reproductive morphology, and nectar reward production of these two species when grown under combined stress conditions (water stress and increasing temperatures). We addressed the following questions: (i) Do the changes in vegetative and reproductive morphology differ between species? (ii) Do these modifications lead to a decrease in floral reward production and/or a modification of floral traits and attractiveness for bees?

2. Material and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Echium plantagineum is a late spring annual species native from the South European Mediterranean region. *Echium vulgare* is a biennial or a short-lived perennial native from the temperate Northern European regions. They are increasingly used in bee-friendly

gardens in temperate Europe. Moreover, *E. plantagineum* is tested in North America as a new crop in support for pollinators in intensive agricultural landscapes (Thom *et al.* 2016). *E. plantagineum* develops a 4-leaf rosette and a branched flowering stem in one season. *E. vulgare* produces a 20-leaf rosette during the first year of growth and one flowering stem during the second year (Klemow *et al.* 2002; Piggin 1982). Plants of both species are 20–60 cm tall. Axillary stems are produced only in the annual species. The inflorescence and flower morphology are similar. For both species, floral stem develop more than 10 scorpioid cymes which include 20–30 showy 5-merous campanulate-tubular flowers. Flowers are hermaphroditic. These two entomophilous species are mainly pollinated by bumblebees, honeybees, and solitary bees (Eberle *et al.* 2014; Klemow *et al.* 2002).

2.2. Growth conditions

Seeds were provided by Semailles nursery (Faulx-les-Tombes, Belgium). Seeds were placed in a germination chamber (Economic Delux model ECD01E; Snijders Scientific, Tilburg, The Netherlands) under 20°C/18°C day/night temperature and a 16-h light (L):8-h dark (D) photoperiod, for 2 weeks. Seedlings were transplanted into pots filled with a 1:1 (v/v) mix of sand (0/5, M Pro, The Netherlands) and universal peat compost (DCM, Amsterdam, The Netherlands). Plants were grown in the greenhouse at the university campus (Louvain-la-Neuve 50°39′58″N; 4°37′9″E, Belgium) and were watered every 2–3 days with rainwater. Treatments were applied after floral transition under controlled conditions in growth chambers (SEFY platform, Louvain-la-Neuve) at different temperature and watering regimes.

To observe the effects of temperature and water stress (and their interaction) on vegetative and reproductive development and photosynthesis-related parameters, fifteen plants per treatment and species were placed under three temperature regimes (21/19°C, 24/22°C, and 27/25°C day/night) and two watering regimes (well-watered compared to water-stressed). The well-watered plants received daily watering (soil humidity about 25%, as determined using a Procheck Hand-held Sensor 10 HS moisture sensor, Decagon Devises, Inc, Pullman WA, USA), whereas the water-stressed plants were watered twice a week (soil humidity of 8–15%). The combination of temperature and watering regimes resulted in six treatments: 21°C well-watered (21WW), 21°C water-stressed (21WS), 24°C well-watered (24WW), 24°C water-stressed (24WS), 27°C well-watered (27WW), and 27°C water-stressed (27WS). In total, 90 plants per species were monitored in three growth chambers. The photoperiod was set to 16L:8D, and relative humidity was maintained at 80 ± 10%. Growth chamber experiments lasted for 6 weeks. Water stress was applied after 1 week of acclimation to the growth chambers; this initial week was considered week 0.

2.3. Morphological traits

At week 0, flowering stem height was measured. Every week for 6 weeks, the number of axillary stems (for *E. plantagineum*), new leaves (>2 cm), inflorescences, and flowers at anthesis were counted per plant. At the end of the experiment (week 5), the height of the main flowering stem was measured to calculate the growth rate.

2.4. Physiological traits

The 5th-node leaves of 10 plants per treatment were measured at the beginning of the experiment and 2 weeks after inducing stress. The chlorophyll content index (CCI) was measured using a chlorophyllometer (Opti-Sciences, CCM-200), and three measurements were taken per leaf. An automatic porometer (AP4 System, Delta-T Devices) was used to measure the stomatal conductance. Gas exchange was measured using an infrared gas analyzer (IRGA ADC BioScientific LCI-SD system, serial No.33413, Hoddesdon, UK). The instantaneous water use efficiency (WUE_i) was calculated as $WUE_i = A_i/E_i$.

2.5. Floral and nectar traits

The corolla depth and diameter were measured three times, at weeks 1, 3, and 5, on 10 random flowers in each treatment. In week 3, flowers were dissected, and floral organs were scanned (Ricoh MP C3004 ex PS). The corolla surface area and the length of all stamens per flower were calculated using ImageJ software.

Nectar was extracted with glass capillary tubes (1, 5, or 10 µl, depending on the nectar volume; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) from five flowers per treatment (from five different plants). Total sugar concentration (°Brix) was measured with a low-volume hand refractometer (Eclipse hand-held refractometer; Bellingham and Stanley, Tunbridge Wells, UK). Nectar sugar content per flower (mg) was calculated following Prys-Jones and Corbet method (1991).

2.6. Statistical analyses

The responses of the two species under both stresses were assessed by Principal Component Analysis (PCA). The normality of the data was estimated using QQ plots and a Shapiro–Wilk test. Physiological and morphological traits were compared between the two species under control conditions (21WW treatment) using a one-way analysis of variance (ANOVA type I). Results for all treatments were presented as relative differences compared with the control treatment 21WW for each species. The relative difference was obtained by subtracting the value of the 21WW treatment from the value of each treatment, divided by the value of the 21WW treatment. This method allowed a comparison of the responses of both species under the two stresses and their interaction.

To evaluate the effects of water and temperature stresses, linear mixed models and ANOVA type II were performed using three fixed factors (temperature × water × week) and plants as the repeated factor. Linear mixed models were used to analyze repeated measurements over time on the same plants. ANOVA type II was performed to analyze data at each time point. All analyses were performed in R 3.5.2, using the 'car' package for F test, 'lme4' package for linear mixed models, and 'FactomineR' package for PCA. Data are presented as means ± standard errors (SE).

3. Results

3.1. Differences in physiology and morphology between the two *Echium* species

To obtain a global overview of the responses of the two species to water and temperature stresses, we conducted a PCA of the vegetative, physiological, and floral parameters. The first two axes of the PCA explained 52.2% of the variance (Fig. 1). Axis 1 highlighted the differences between the two species and separated them based on differences in physiology (chlorophyll content, PSII efficiency), morphology (leaf number, corolla surface area), and nectar rewards (total sugar content). In the absence of stress (21WW), the annual *E. plantagineum* scored higher than the biennial species *E. vulgare* for morphological characteristics and for some physiological traits (Table 1). The annual species also produced larger flowers than the biennial species, but less nectar with a lower sugar concentration (Table 1).

Both species showed substantial responses to increasing temperatures and water stress (Fig. 1 A, B). Axis 2 highlighted the influence of stress on floral parameters when compared to non-stressful conditions. Flower size (diameter, depth, and surface area of the corolla) decreased under both stresses for both species. The *E. plantagineum* response range was broader than that of *E. vulgare*.

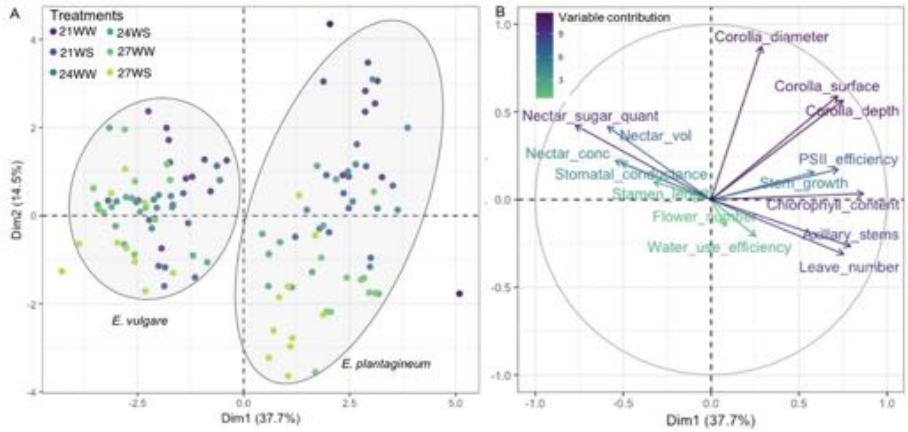


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) of vegetative, physiological, and floral parameters of *E. plantagineum* and *E. vulgare* plants grown under different temperatures (21°C, 24°C, 27°C) and watering regimes (WW, well-watered; WS, water-stressed). (A) Individual graph, (B) variable graph of PCA.

Table 1. Descriptive parameters related to morphology, physiology and floral traits of *E. plantagineum* and *E. vulgare* grown at 21°C with watering (*N*=10 per species).

Descriptive parameter	*E. plantagineum*	*E. vulgare*	Species effect [c]
(A) Vegetative traits			
Number of leaves [a]	54.8 ± 7.3	26.0 ± 2.0	$F_{1,18}$ = 14.59, ***p*=0.001**
Main stem growth rate (%) [b]	154.5 ± 30.0	42.9 ± 13.6	$F_{1,18}$ = 11.61, ***p*=0.003**
(B) Physiological parameters			
Chlorophyll content [a]	47.1 ± 1.94	22.0 ± 3.94	$F_{1,17}$ = 64.16, ***p*<0.001**
Photosystem II efficiency [a]	0.87 ± 0.01	0.84 ± 0.01	$F_{1,12}$ = 4.98, ***p*=0.045**
Stomatal conductance ($mmol.m^{-2}.s^{-1}$) [a]	153.1 ± 14.7	197.4 ± 35.6	$F_{1,18}$ = 2.64, p=0.12
Water use efficiency (µmol CO_2. mmol H_2O) [a]	1.02 ± 0.16	1.94 ± 0.51	$F_{1,16}$ = 5.86, ***p*=0.028**
(C) Floral traits			
Flower production [b]	361 ± 65	391 ± 55	$F_{1,18}$ = 0.13, p=0.72
Corolla surface (mm^2) [a]	515 ± 35	195 ± 8	$F_{1,13}$ = 48.05, ***p*<0.001**
Stamen length (mm) [a]	19.4 ± 0.9	14.7 ± 0.4	$F_{1,13}$ = 14.52, ***p*=0.002**
Nectar sugar quantity per flower (mg) [a]	0.4 ± 0.1	1.9 ± 0.2	$F_{1,17}$ = 35.92, ***p*<0.001**
Nectar volume (µl) [a]	1.8 ± 0.3	3.5 ± 0.6	$F_{1,17}$ = 5.85, ***p*=0.03**
Nectar concentration (D° brix) [a]	27.6 ± 4.1	47.1 ± 3.6	$F_{1,17}$ = 12.13, ***p*=0.003**

[a] 3 weeks of experiment ; [b] 5 weeks of experiment ; [c] significant p-values are in bold font

3.2. Photosynthesis-related parameters

We compared the influence of temperature and water stresses on vegetative morphology for both species. The vegetative growth of *E. plantagineum* was negatively affected mainly by water stress (Table 2). The number of leaves on the main stem decreased under water stress and increasing temperatures, particularly at 27WS (Fig. 2A), and the growth rate of the main stem was significantly lower for water-stressed plants (105 ± 19%) than for well-watered plants (160 ± 32%; Table 2). However, one week after the stress imposition, *E. plantagineum* plants still produced axillary stems (Fig. 2C) and initiated new leaves on these axillary stems (Fig. 2D). Three weeks later, the number of leaves on axillary stems at 27WW was significantly higher than at 21WW ($F_{5,54} = 3.49$; $p = 0.008$). Thereafter, the number of leaves decreased at 27°C, whereas it continued to increase at 21°C and remained constant at 24°C (Fig. 2D). Water stress reduced the number of axillary stems and the number of leaves on those stems at all temperatures (Fig. 2C, D).

The response of *E. vulgare* plants was different: the number of leaves on the main stem decreased significantly at increasing temperatures but was not affected by water stress (Fig. 2B; Table 2). Neither of the stresses influenced stem growth rate, which reached 41 ± 15% regardless of the treatment (5 weeks after stress imposition; Table 2). *E. vulgare* maintained its growth while exhibiting foliar senescence, whereas *E. plantagineum* exhibited reduced growth and foliar senescence but simultaneously initiated new leaves.

The two species had different physiological responses to increasing temperatures and water stress. Chlorophyll content was significantly reduced in *E. plantagineum* in response to increasing temperatures, whereas it was significantly reduced in *E. vulgare* in response to water stress (Table 2; Fig. 3C). For both species, increasing temperatures but not water stress significantly decreased the efficiency of photosystem II (Table 2; Fig. 3A).
Increasing temperatures affected stomatal conductance and water use efficiency (WUE) for both species, whereas water stress significantly affected these parameters only for *E. plantagineum* (Table 2; Fig. 3B, D). However, the effects of the stresses differed between the species. WUE increased under stress in *E. plantagineum* and decreased in *E. vulgare* compared to 21WW (Fig. 3D). In the two species, both light-dependent and light-independent photosynthesis reactions were affected by stresses, and mainly by increasing temperatures.

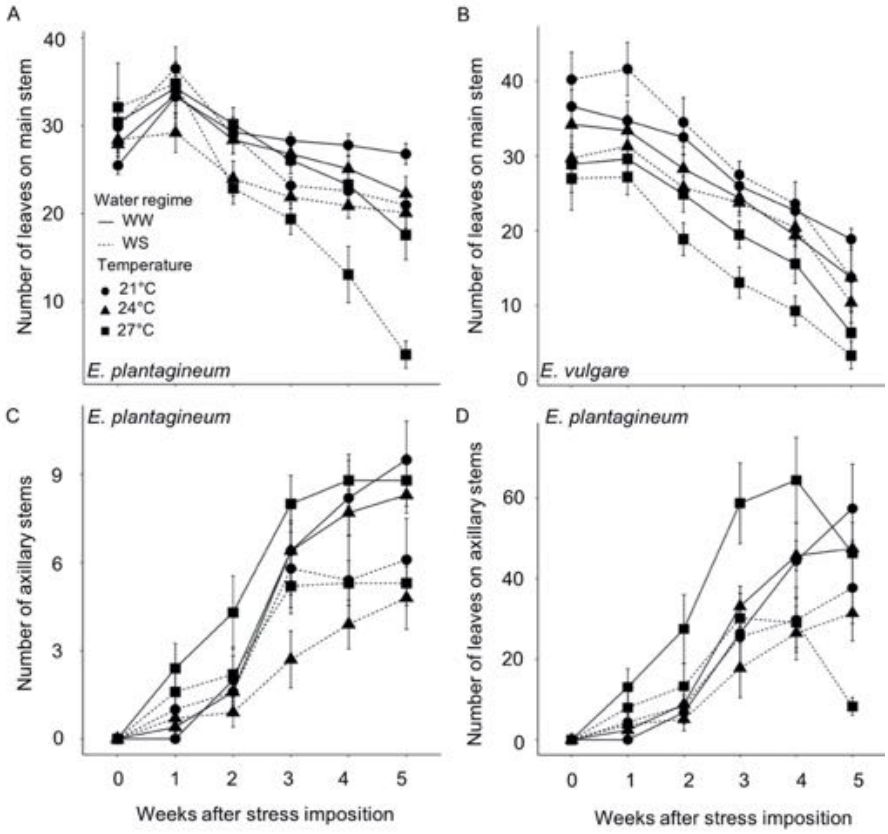


Fig. 2. Effects of increasing temperatures and water stress on the number of leaves on the main stem for (A) *E. plantagineum* and (B) *E. vulgare*, and on (C) the number of axillary stems and (D) the number of leaves on axillary stems for *E. plantagineum*. *N*=10 per treatment in each species. Data are relative values compared to 21WW (means ± SE). WW, well-watered; WS, water-stressed.

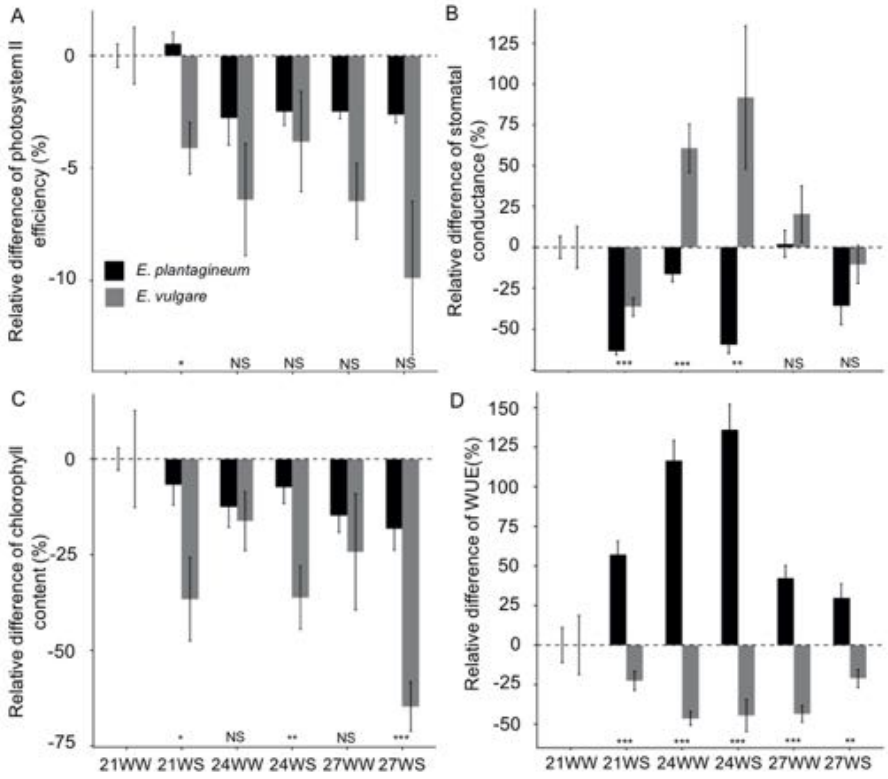


Fig. 3. Effects of increasing temperatures and water stress on physiological parameters of *E. plantagineum* and *E. vulgare* plants. (A) Photosystem II efficiency, (B) chlorophyll content, (C) stomatal conductance, and (D) water use efficiency 2 weeks after initiating stress treatments. *N*=10 per treatment in each species. Data are relative values compared to 21WW (means ± SE). Species are significantly different (one-way ANOVA) under the same treatment at $p<0.001$ (***), $p<0.01$ (**), or $p<0.05$ (*). NS, non-significant difference. 21 = 21°C; 24 = 24°C; 27 = 27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed.

Table 2. Statistical results of the effects of increasing temperatures (Temp), water stress (Water), and their interaction (Temp*Water) on vegetative and physiological traits of *E. plantagineum* and *E. vulgare*. Significative p-value is in bold font.

Parameter	Species	Temp	Water	Temp*Water
Number of leaves on main stem [a]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 6.61$, $\mathbf{p = 0.002}$	$F_{1,54} = 17.86$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,54} = 2.36$, $p = 0.10$
	E. vulgare	$F_{2,54} = 25.00$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,54} = 1.58$, $p = 0.21$	$F_{2,54} = 2.06$, $p = 0.14$
Number of axillary stems [a]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 1.67$, $p = 0.19$	$F_{1,54} = 9.63$, $\mathbf{p = 0.003}$	$F_{2,54} = 0.37$, $p = 0.69$
Number of leaves on axillary stems [a]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 1.07$, $p = 0.35$	$F_{1,54} = 9.53$, $\mathbf{p = 0.003}$	$F_{2,54} = 1.58$, $p = 0.21$
Main stem growth rate (%)[b]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 0.12$, $p = 0.88$	$F_{1,54} = 6.21$, $\mathbf{p = 0.02}$	$F_{2,54} = 0.18$, $p = 0.84$
	E. vulgare	$F_{2,53} = 0.18$, $p = 0.84$	$F_{1,53} = 0.14$, $p = 0.71$	$F_{2,54} = 0.46$ $p = 0.64$
Chlorophyll content [c]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 4.88$, $\mathbf{p = 0.01}$	$F_{1,54} = 0.40$, $p = 0.53$	$F_{2,54} = 0.51$, $p = 0.51$
	E. vulgare	$F_{2,49} = 2.87$, $p = 0.06$	$F_{1,49} = 12.66$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,49} = 0.49$, $p = 0.62$
Photosystem II efficiency [c]	*E. plantagineum*	$F_{2,24} = 6.30$, $\mathbf{p = 0.006}$	$F_{1,24} = 0.09$, $p = 0.76$	$F_{2,24} = 0.07$, $p = 0.94$
	E. vulgare	$F_{2,50} = 3.46$, $\mathbf{p = 0.04}$	$F_{1,50} = 0.80$, $p = 0.38$	$F_{2,50} = 1.41$, $p = 0.25$
Stomatal conductance (mmol m^{-2} s^{-1}) [c]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 4.58$, $\mathbf{p = 0.01}$	$F_{1,54} = 67.70$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,54} = 1.79$, $p = 0.18$
	E. vulgare	$F_{2,51} = 10.20$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,51} = 0.47$, $p = 0.50$	$F_{2,51} = 1.50$, $p = 0.23$
WUE (A/E) (µmol CO_2 mmol H_2O^{-1}) [c]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 47.23$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,54} = 5.54$, $\mathbf{p = 0.02}$	$F_{2,54} = 4.90$, $\mathbf{p = 0.01}$
	E. vulgare	$F_{2,31} = 3.80$, $\mathbf{p = 0.03}$	$F_{1,31} = 0.02$, $p = 0.88$	$F_{2,31} = 1.56$, $p = 0.23$

[a] linear mixed model (5 weeks of experiment) ; [b] two-way ANOVA (week 5) ; [c] two-way ANOVA (week 2)

3.3. The influence of temperature and water stresses on reproductive morphology

3.3.1. Floral display and flowering phenology

Water stress reduced the total number of flowers produced in both species and the number of open flowers per plant in *E. plantagineum* (Fig. 4A, B; Tables 3–4). *E. plantagineum* produced more flowers at 24°C and 27°C than at 21°C, whereas no significant increase was observed in flower production in *E. vulgare* (Table 3; Fig. 4C, D). During the first two weeks, stress had little effect on flower production in *E. vulgare* plants, which decreased slightly for 24WS and 27WS treatments from week 3 onwards (Fig. 4B). After 5 weeks, all plants were at the end of their flowering period (except for those under 21WW conditions). Flower production in *E. plantagineum* was quite similar in the beginning, regardless of the treatment, but increased sharply at 27°C (Fig. 4 C). The peak of flowering occurred after 2 weeks for 27WW, after 4 weeks for 24WW, and seemed not to be reached for 21WW, even after 5 weeks (Fig. 4A). Although *E. plantagineum* continued flowering after 5 weeks at 21°C and 24°C, it was reduced at 27°C.

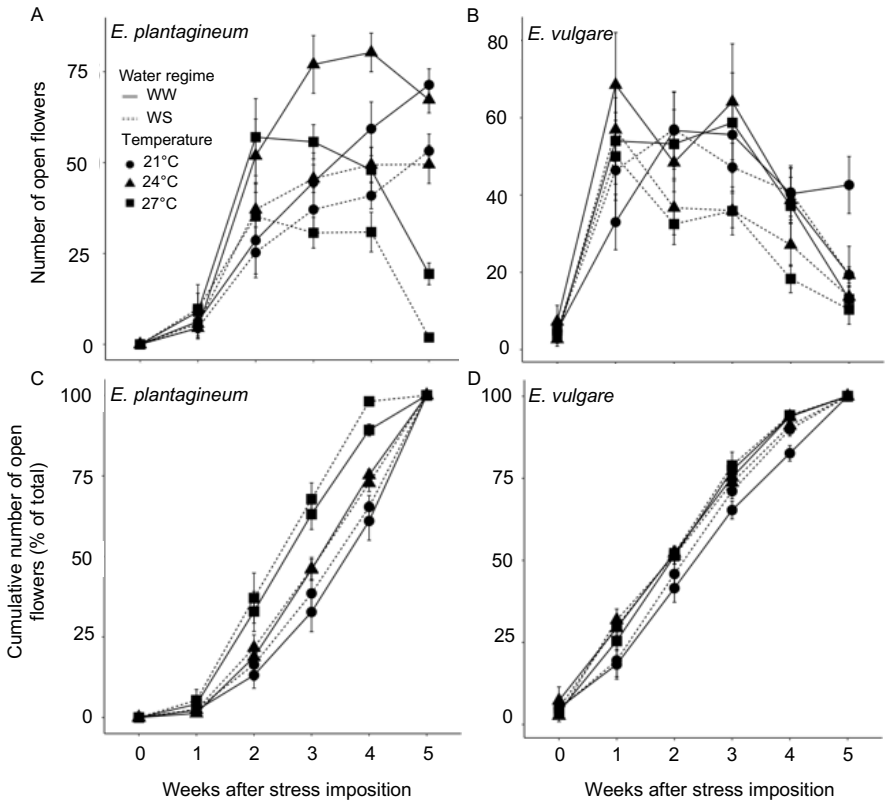


Fig. 4. Effects of increasing temperatures and water stress on (A, B) the number of open flowers produced per plant per week and (C, D) the cumulative number of open flowers (% of total) produced per week by (A, C) *E. plantagineum* and (B, D) *E. vulgare* plants. *N*=10 per treatment in each species. Data are relative values compared to 21WW (means ± SE). WW, well-watered; WS, water-stressed.

Table 3. Statistical results of the effects of increasing temperatures (Temp), water stress (Water) and their interaction (Temp*Water) on floral traits of *E. plantagineum* and *E. vulgare*. Significative p-value is in bold font.

Parameter	Species	Temp	Water	Temp*Water
Number of flowers produced after 5 weeks [a]	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 15.12$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,54} = 27.62$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,54} = 1.65$, $p = 0.20$
	E. vulgare	$F_{2,54} = 0.73$, $p = 0.48$	$F_{1,54} = 6.31$, $\mathbf{p = 0.02}$	$F_{2,54} = 0.41$, $p = 0.67$
Number of open flowers per week	*E. plantagineum*	$F_{2,54} = 11.94$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,54} = 27.12$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,54} = 0.85$, $p = 0.43$
	E. vulgare	$F_{2,54} = 0.63$, $p = 0.54$	$F_{1,54} = 3.01$, $p = 0.09$	$F_{2,54} = 0.38$, $p = 0.69$
Corolla surface (mm^2) [b]	*E. plantagineum*	$F_{2,51} = 42.24$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,51} = 17.21$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,51} = 0.88$, $p = 0.42$
	E. vulgare	$F_{2,30} = 1.03$, $p = 0.37$	$F_{1,30} = 50.88$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,30} = 3.05$, $p = 0.06$
Stamen length (mm) [b]	*E. plantagineum*	$F_{2,51} = 14.00$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,51} = 8.19$, $\mathbf{p = 0.006}$	$F_{2,51} = 0.88$, $p = 0.42$
	E. vulgare	$F_{2,30} = 5.84$, $\mathbf{p = 0.007}$	$F_{1,30} = 41.95$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,30} = 0.35$, $p = 0.71$
Corolla depth (mm) [c]	*E. plantagineum*	$F_{2,52} = 107.81$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,52} = 41.56$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,50} = 0.20$, $p = 0.82$
	E.vulgare	$F_{2,53} = 28.12$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,53} = 38.65$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,53} = 2.11$, $p = 0.13$
Corolla diameter (mm) [c]	*E. plantagineum*	$F_{2,50} = 106.37$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,50} = 36.28$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,50} = 0.04$, $p = 0.96$
	E.vulgare	$F_{2,53} = 33.92$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,53} = 33.41$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,53} = 2.56$, $p = 0.09$
Nectar sugar quantity (mg) [b]	*E. plantagineum*	$F_{2,51} = 8.47$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,51} = 22.62$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,51} = 2.95$, $p = 0.06$
	E.vulgare	$F_{2,52} = 0.48$, $p = 0.62$	$F_{1,52} = 3.03$, $p = 0.09$	$F_{2,52} = 1.54$, $p = 0.22$
Nectar volume (µl) [b]	*E. plantagineum*	$F_{2,52} = 5.22$, $\mathbf{p = 0.009}$	$F_{1,52} = 34.12$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,51} = 2.94$, $p = 0.06$
	E.vulgare	$F_{2,52} = 0.63$, $p = 0.54$	$F_{1,52} = 0.11$, $p = 0.74$	$F_{2,52} = 0.43$, $p = 0.65$
Nectar concentration (°Brix) [b]	*E. plantagineum*	$F_{2,51} = 7.88$, $\mathbf{p = 0.01}$	$F_{1,51} = 11.36$, $\mathbf{p = 0.01}$	$F_{2,51} = 1.26$, $p = 0.29$
	E.vulgare	$F_{2,52} = 0.13$, $p = 0.88$	$F_{1,52} = 0.85$, $p = 0.36$	$F_{2,52} = 0.69$, $p = 0.51$

[a] two-way ANOVA (week 5) ; [b] two-way ANOVA (week 3) ; [c] linear mixed model (5 weeks of experiment)

Table 4. Effects of increasing temperatures and water stress on floral traits of *E. plantagineum* and *E. vulgare* (3 weeks after stress induction, except for number of flowers produced).

Species	Treat-ment[a]	Number of flowers produced after 5 weeks[b]	Corolla surface (cm^2)[b]	Stamen length (mm)[b]	Nectar sugar concentra-tion (D° Brix)[b]	Nectar volume (µl)[b]	Nectar sugar quantity (mg)[b]
E. plantagineum	21WW	361 ± 65 bc	5.15 ± 0.34 a	19.4 ± 0.9 a	27.6 ± 4.1 b	1.80 ± 0.34 a	0.56 ± 0.12 a
	21WS	241 ± 22 c	3.99 ± 0.33 ab	17.6 ± 0.8 ab	35.6 ± 3.1 ab	0.47 ± 0.08 c	0.18 ± 0.03 b
	24WW	511 ± 25 ab	4.26 ± 0.30 a	18.0 ± 0.9 ab	30.1 ± 6.3 b	1.45± 0.32 ab	0.36 ± 0.06 a
	24WS	369 ± 30 bc	2.95 ± 0.33 bc	15.3 ± 1.0 bc	47.6 ± 2.7 a	0.21 ± 0.03 c	0.12 ± 0.02 b
	27WW	646 ± 48 a	2.05 ± 0.24 cd	14.5 ± 0.7 bc	20.3 ± 1.2 b	0.61 ± 0.17 bc	0.15 ± 0.05 bc
	27WS	361 ± 65 bc	1.50 ± 0.15 d	12.8 ± 0.8 c	26.5 ± 2.9 b	0.21 ± 0.04 c	0.06 ± 0.01 c
E. vulgare	21WW	391 ± 55 a	1.95 ± 0.08 a	14.7 ± 0.4 a	47.1 ± 3.6 a	3.52 ± 0.59 a	1.83 ± 0.17 a
	21WS	306 ± 37 a	1.07 ± 0.09 bc	10.8 ± 0.5 bcd	43.6 ± 5.1 a	2.87 ± 0.42 a	1.35 ± 0.19 a
	24WW	496 ± 100 a	1.77 ± 0.10 a	13.1 ± 0.8 ab	46.1 ± 3.8 a	2.61 ± 0.30 a	1.36 ± 0.13 a
	24WS	318 ± 38 a	0.98 ± 0.07 c	10.0 ± 0.2 cd	47.8 ± 3.1 a	2.74 ± 0.55 a	1.47 ± 0.20 a
	27WW	559 ± 131 a	1.53 ± 0.06 ab	12.1 ± 0.3 abc	50.9 ± 2.8 a	2.73 ± 0.38 a	1.66 ± 0.22 a
	27WS	330 ± 74 a	1.19 ± 0.12 bc	9.2 ± 0.5 d	42.9 ± 5.4 a	2.88 ± 0.62 a	1.22 ± 0.18 a

[a] 21 = 21°C; 24 = 24°C; 27 = 27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed ; [b] Data are means ± SE (N=10). Data followed by different letters for each parameter are significantly different (one-way ANOVA) at p<0.05 among treatments

3.3.2. Floral morphology

Increasing temperature and water stress had a negative impact on flower morphology in both species. Corolla surface area decreased with increasing temperatures only in *E. plantagineum,* whereas it decreased in both species under water stress (Tables 3–4). Under combined water and temperature stress conditions (27WS), the corolla surface area for *E. plantagineum* decreased to about 30% of the control (21WW; 150 ± 15 vs 515 ± 34 mm²) and for *E. vulgare* to about 61% of the control (119 ± 12 vs 195 ± 8 mm²) (Table 4). The mean stamen length was negatively affected by increasing temperatures and water stress in both species: stamen length decreased with increasing stress intensity in *E. plantagineum,* whereas it mainly decreased under water stress in *E. vulgare* (Tables 3–4). Corolla depth and diameter were also negatively impacted by both temperature and water stress, with greater reductions in *E. plantagineum* than in *E. vulgare* (Fig. 5; Table 3). The range of response was larger in *E. plantagineum* than in *E. vulgare* for floral traits: the difference in corolla surface area, depth, and diameter between the control (21WW) and the most stressful treatment (27WS) was greater for *E. plantagineum* than for *E. vulgare*.

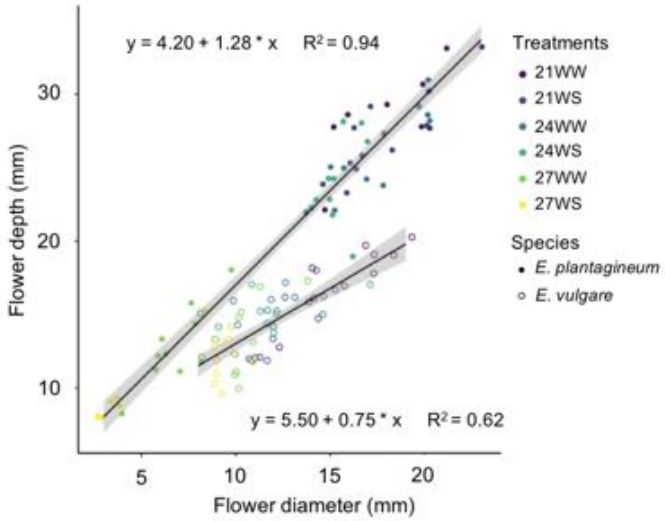


Fig. 5. Effects of increasing temperatures and water stress on corolla depth and diameter of *E. plantagineum* and *E. vulgare* 5 weeks after stress initiation. *N*=10 per treatment in each species. The regression equation and R^2 value are given for each species. 21 = 21°C; 24 = 24°C; 27 = 27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed.

3.3.3. Nectar rewards

Temperature and water stress did not significantly decrease nectar production in *E. vulgare* but did in *E. plantagineum* (Tables 3–4). The sugar concentration of *E. plantagineum* nectar increased under water stress and decreased at 27°C compared to the 21WW treatment. However, the nectar volume significantly decreased in *E. plantagineum* flowers under both

temperature and water stress. In consequence, nectar sugar content per flower decreased under both stresses in this species (Table 4).

4. Discussion

The annual species, *E. plantagineum,* was more affected by increasing temperatures and water stress compared to the biennial, *E. vulgare* (Fig. 6). For both species, increasing temperatures negatively affected photosynthesis parameters and both stresses reduced flower size. A major difference between the two species concerned nectar production: while it was negatively affected by both stresses for *E. plantagineum*, *E. vulgare* maintained its nectar production under stress.

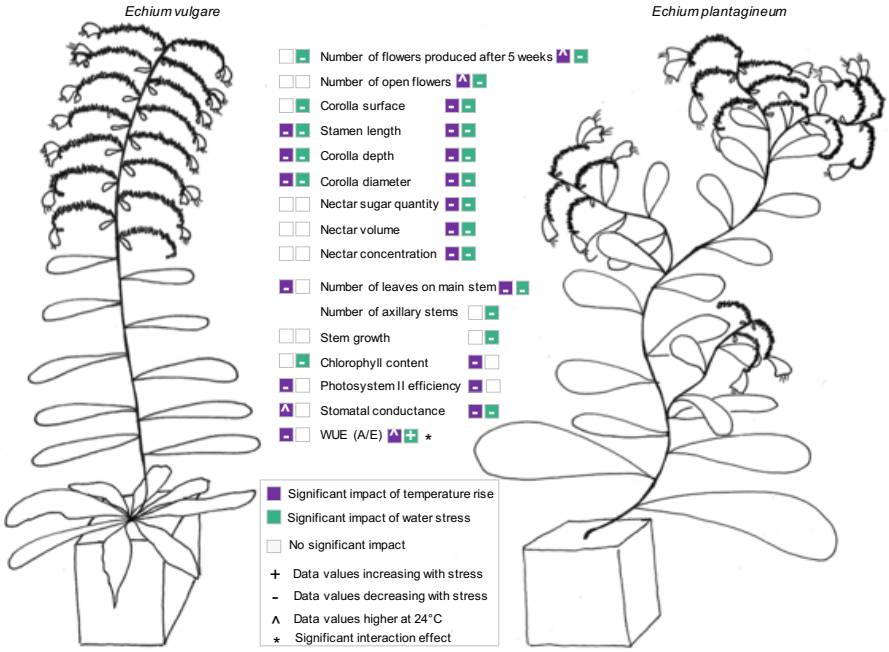


Fig. 6: Impact of increasing temperatures and water stress on the morphological, physiological, and floral traits of *E. plantagineum* and *E. vulgare* plants grown under different temperatures (21°C, 24°C, 27°C) and watering regimes (WW, well-watered; WS, water-stressed). Significant impact means statistically significant impact.

For both species, increasing temperatures mainly affected photosynthetic reactions. In *E. plantagineum*, both chlorophyll content and PSII efficiency decreased in response to increasing temperatures. However, in *E. vulgare*, only PSII efficiency was affected by increasing temperatures whereas chlorophyll content was reduced by water stress. Even if species were not affected by the same stress, these abiotic stresses compromised the light-dependent photosynthetic reactions. With respect to light-independent photosynthetic activity, the two species showed contrasting responses to stress. For *E.*

plantagineum, stomatal conductance slightly decreased at 24°C, but drastically decreased under water stress. Reducing stomatal conductance is a mechanism that minimizes water loss and is a common response to water stress in plants that tend to avoid abiotic stresses through physiological adjustments (Lamaoui et al. 2018; Sehgal et al. 2019). Consequently, the WUE was higher for water-stressed plants compared to well-watered plants (except at 27°C) and WUE was higher at 24°C compared to other temperatures, suggesting that the plants performed well at 24°C. For *E. vulgare*, stomatal conductance increased at 24°C and no effect of water stress was detected. This species did not close stomata under water stress, suggesting that it has developed osmotic adjustment mechanisms that maintain high water content in the plant without stomatal closure. The two species differ thus in their physiological reaction to these abiotic stresses. Wu et al. (2010) reported that several annual plants had higher WUE in water-limited environments. Adopting a conservative water use strategy could be advantageous for reproduction in annuals, as their growing period is short.

The decrease in photosynthesis with increasing temperatures was associated with a decrease in the number of leaves on the main stem in both species. At all temperatures, the number of leaves on the main stem decreased over time due to leaf senescence and, for *E. plantagineum*, this effect was reinforced by water stress. Leaf senescence can be induced by temperature and water stresses (Sivakumar and Srividhya 2016; Xu and Huang 2007; Wu et al. 2010). However, *E. plantagineum* compensated for this foliar senescence by initiating new leaves on axillary stems, which was not the case for *E. vulgare*. The production of new leaves on the main stem was particularly high in the 27WW treatment between weeks 2 and 4, consistent with previous reports that increasing temperatures can promote leaf development up to a specific optimum temperature (Gray and Brady 2016).

We observed that increasing temperatures tended to increase the total number of flowers in *E. plantagineum* but did not affect flower production in *E. vulgare*. This result is in contrast to several studies that reported a temperature stress-induced reduction of flower production for both annual and perennial species (Liu et al. 2012; Takkis et al. 2018). For both *E. plantagineum* and *E. vulgare*, water stress resulted in a decrease in the total number of flowers, and consequently in the overall floral display, with a greater reduction in the annual *E. plantagineum*. Similar results under water stress conditions have been reported in previous studies (Al-Ghzawi et al., 2009; Phillips et al., 2018). On the contrary, *Mertensia ciliata* maintained its floral display under water stress because this species is able to use stored resources to restart its spring growth; therefore, the effects of water stress are only felt after several consecutive years of drought (Gallagher and Campbell 2017). Flowering phenology also responded differently to stress in the two species. Phenology was mostly unaffected by stress in *E. vulgare*, compared to the relatively large differences observed between stressed and unstressed plants in *E. plantagineum*. *Echium vulgare* plants, except under 21WW, stopped flowering after 5 weeks, whereas *E. plantagineum* continued flowering after 5 weeks, except in the 27WW and 27WS treatments. *Echium plantagineum*

accelerated its life cycle under stress, particularly at 27°C, whereas the *E. vulgare* maintained similar developmental rates under all conditions.

Flower size (corolla surface area, depth, and diameter) was reduced by both stresses in our two species. *Echium vulgare* flowers (at 27WS) were on average two times smaller and *E. plantagineum* flowers five times smaller than control flowers (at 21WW). Reduced flower size (sepals, petals, and stamens) under stress has already been reported for annuals (Descamps et al., 2018; Waser & Price, 2016), biennials, and perennials (Carroll et al. 2001; Gallagher and Campbell 2017; Halpern et al. 2010; Opedal et al. 2016). Producing smaller flowers, which lose less water through transpiration and evaporation, can be advantageous during abiotic stress (Galen 1999; Halpern et al. 2010).

Nectar volume for water-stressed *E. plantagineum* plants was on average five times lower (0.30 µl/flower) than that produced by well-watered plants (1.62 µl/flower at 21°C and 24°C). Several studies have shown that nectar volume decreased in water-stressed plants (Carroll et al. 2001; Gallagher and Campbell 2017; Halpern et al. 2010; Waser and Price 2016). These volume decreases were usually associated with an increase in nectar concentration in water-stressed plants (Halpern et al. 2010; Takkis et al. 2018). However, several studies reported no rise in sugar concentration under water stress and increasing temperatures (Carroll et al. 2001; Descamps et al. 2018; Gallagher and Campbell 2017; Mu et al. 2015). At 21°C and 24°C, the WUE of *E. plantagineum* increased and photosynthetic activity was maintained, suggesting that carbohydrate production was also maintained. Even so, the total nectar sugar content produced per plant decreased as stress intensity increased. By contrast, in *E. vulgare*, the nectar rewards (i.e., total sugar content, nectar volume, and nectar concentration) did not change under temperature and water stresses. Phillips et al. (2018) observed similar results for *Lathyrus pratensis*, *Onobrychis viciifolia*, and *Prunella vulgaris*, in calcareous grasslands and attributed the maintenance of the nectar rewards to resistance to water stress for these species in this type of habitat. These results indicate that *E. plantagineum* and *E. vulgare* have different strategies for facing abiotic stress. This difference may be explained by life history traits. Biennials have the option to allocate all their resources to vegetative development during the first year; during the second year, all first-year resources can then be invested in reproductive development.

Under increasing temperatures, both species produced smaller flowers and fewer flowers per plant. However, floral display and flower size are signals for pollinators. Decreased flower size can reduce flower attractiveness and consequently insect visitation rates and pollination success (Al-Ghzawi et al., 2009). Moreover, the reduced size of the stressed flowers of *E. plantagineum* was so substantial that it may cause a morphological mismatch with the pollinators. Long tongued (> 10 mm long) bumblebee species (e.g., *Bombus pascuorum* and *B. hortorum*) are among the main pollinators of *Echium* spp. (S. Marée, personal com.). Reduced corolla size and tube depth could alter the efficiency of the visitors (Miller-Struttmann et al. 2015). Furthermore, if floral display is reduced, plant attractiveness is reduced. Nectar production of *E. plantagineum* was reduced by abiotic

stresses making the species more vulnerable to pollination disruption than *E. vulgare*. Because nectar rewards attract pollinators, reduced quantities of nectar could decrease attractiveness, visitation rates, and pollination success. Such disruptions in plant-pollinator interactions include both morphological (corolla size and depth) and recognition (attractiveness linked to nectar production, VOCs emission) mismatches (Gérard et al. 2020).

Acknowledgments
We thank C. Buyens, E. Descamps and S. Françoisse for technical assistance. We are grateful to G.R.P.V. laboratory (Groupe de Recherche en Physiologie Végétale, S. Lutts) for lending measuring instruments for physiological parameters. Thank to Jennifer Mach for language improvement and the two anonymous reviewers for their valuable comments on the first version of the manuscript. This work is a part of a Ph.D. (C. Descamps) and master thesis of Aurélie Baijot. There is no conflict of interest.

Author contribution
C.D., M.Q., and A.-L.J. designed the experiments; S.H., S.M., and C.D. performed experiments and collected the data ; M.Q. and A.-L.J. supervised the study ; C.D., A.-L.J., M.Q. wrote the manuscript. All authors revised the draft manuscript and read and approved the final manuscript.

Data availability statement
Descamps, Charlotte *et al.* (2020), Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (Echium, Boraginaceae), Dryad, Dataset, https://doi.org/10.5061/dryad.9w0vt4bc0

5. References

Al-Ghzawi AA-M, Zaitoun S, Gosheh H, *et al.* (2009) Impacts of drought on pollination of *Trigonella moabitica* (Fabaceae) via bee visitations. *Arch Agro Soil Sci* **55**: 683–692.

Awasthi R, Kaushal N, Vadez V, *et al.* (2014) Individual and combined effects of transient drought and heat stress on carbon assimilation and seed filling in chickpea. *Funct Plant Biol* **41**: 1148–1167.

Barnabás B, Jäger K, Fehér A (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* **31**: 11–38.

Borghi M, Perez de Souza L, Yoshida T, *et al.* (2019) Flowers and climate change: a metabolic perspective. *New Phytol* **224**: 1425–1441.

Carroll AB, Pallardy SG, Galen C (2001) Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Am J Bot* **88**: 438–446.

Cohen JM, Lajeunesse MJ, Rohr JR (2018) A global synthesis of animal phenological responses to climate change. *Nat Clim Change* **8**: 224–228.

Descamps C, Quinet M, Baijot A, *et al.* (2018) Temperature and water stress affect plant–pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecol Evol* **8**: 3443–3456.

Devasirvatham V, Tan DKY, Trethowan RM (2016) Breeding strategies for enhanced plant tolerance to heat stress In: Advances in plant breeding strategies: agronomic, abiotic and biotic stress traits. Springer, Cham, 447–469.

Eberle CA, Forcella F, Gesch R, *et al.* (2014) Flowering dynamics and pollinator visitation of oilseed *Echium* (*Echium plantagineum*). *PLOS ONE* **9**: e113556.

Forrest JRK (2016) Insect pollinators and climate change In: Global Climate Change and Terrestrial Invertebrates. Wiley-Blackwell. 71–91.
Galen C (1999) Why do flowers vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioSci* **49**: 631–640.

Gallagher MK, Campbell DR (2017) Shifts in water availability mediate plant–pollinator interactions. *New Phytol* **215**: 792–802.

Gérard M, Vanderplanck M, Wood T, *et al.* (2020) Global warming and plant-pollinator mismatches. *Emerg Top Life Sci* ETLS20190139.

Glenny WR, Runyon JB, Burkle LA (2018) Drought and increased CO_2 alter floral visual and olfactory traits with context-dependent effects on pollinator visitation. *New Phytol* **220**: 785–798.

Gray SB, Brady SM (2016) Plant developmental responses to climate change. *J Dev Biol* **419**: 64–77.

Halpern SL, Adler LS, Wink M (2010) Leaf herbivory and drought stress affect floral attractive and defensive traits in *Nicotiana quadrivalvis*. *Oecol* **163**: 961–971.

IPCC (2018) Global Warming of 1.5°C, an IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty. Geneva, Switzerland.

Klemow KM, Clements DR, Threadgill PF, *et al.* (2002) The biology of Canadian weeds. 116. *Echium vulgare* L. *Canad J Plant Sci* **82**: 235–248

Lamaoui M, Jemo M, Datla R, *et al.* (2018) Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Front Chem* **6**: 26.

Liu Y, Mu J, Niklas KJ, Li G, *et al.* (2012) Global warming reduces plant reproductive output for temperate multi-inflorescence species on the Tibetan plateau. *New Phytol* **195**: 427–436.

Miller-Struttmann NE, Geib JC, Franklin JD, *et al.* (2015) Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science* **349**: 1541–1544.

Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**: 15–19.

Mu J, Peng Y, Xi X, *et al.* (2015) Artificial asymmetric warming reduces nectar yield in a Tibetan alpine species of Asteraceae. *Ann Bot* **116**: 899–906.

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

Opedal ØH, Listemann J, Albertsen E, *et al.* (2016) Multiple Effects of Drought on Pollination and Mating-System Traits in *Dalechampia scandens*. *Int J Plant Sci* **177**: 682–693.

Orians CM, Schweiger R, Dukes JS, *et al.* (2019) Combined impacts of prolonged drought and warming on plant size and foliar chemistry. *Ann Bot* **124**: 41–52.

Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Front Plant Sci* **6**: 723.

Piggin CM (1982) Biology of Australian weeds. 8. *Echium plantagineum* L. *Aust J Inst Agri Sci.* **48**: 3–16.

Phillips BB, Shaw RF, Holland MJ, *et al.* (2018) Drought reduces floral resources for pollinators. *Global Change Biol* **24**: 3226–3235.

Prieto P, Peñuelas J, Ogaya R, *et al.* (2008) Precipitation-dependent flowering of *Globularia alypum* and *Erica multiflora* in Mediterranean shrubland under experimental drought and warming, and its inter-annual variability. *Ann Bot* **102**: 275–285.

Prys-Jones OE, Corbet SA (1991) Naturalists' Handbooks 6: Bumblebees. Slough: Richmond Publishing Co. Ltd.

Rizhsky L, Liang H, Shuman J, *et al.* (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* **134**: 1683–1696.

Scheepens JF, Deng Y, Bossdorf O (2018) Phenotypic plasticity in response to temperature fluctuations is genetically variable, and relates to climatic variability of origin, in *Arabidopsis thaliana*. *AoB Plants* **10**: ply043.

Sehgal A, Sita K, Bhandari K, *et al.* (2019) Influence of drought and heat stress, applied independently or in combination during seed development, on qualitative and quantitative aspects of seeds of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes, differing in drought sensitivity. *Plant Cell Envi* **42**: 198–211.

Sivakumar R, Srividhya S (2016) Impact of drought on flowering, yield and quality parameters in diverse genotypes of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Adv Hortic Sci* **30**: 3-11–11.

Takkis K, Tscheulin T, Petanidou T (2018) Differential effects of climate warming on the nectar secretion of early- and late-flowering Mediterranean plants. *Front Plant Sci* **9**: 874.
Thom M, Eberle C, Forcella F, Gesch R, *et al.* (2016) Nectar production in oilseeds: Food for pollinators in an agricultural landscape. *Crop Sci* **56** : 727–739.

Thomson DM (2016) Local bumble bee decline linked to recovery of honey bees, drought effects on floral resources. *Ecol Lett* **19**: 1247–1255.

Walter J (2018) Effects of changes in soil moisture and precipitation patterns on plant-mediated biotic interactions in terrestrial ecosystems. *Plant Ecol* **219**: 1449–1462.

Waser NM, Price MV (2016) Drought, pollen and nectar availability, and pollination success. *Ecol* **97**: 1400–1409.

Wu CA, Lowry DB, Nutter LI, *et al.* (2010) Natural variation for drought-response traits in the *Mimulus guttatus* species complex. *Oecol* **162**: 23–33.

Xu Y, Huang B (2007) Heat-induced leaf senescence and hormonal changes for thermal bentgrass and turf-type bentgrass species differing in heat tolerance. *J Am Soc Hortic Sci* **132**: 185–192.

Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, *et al.* (2018) Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol Plant* **162**: 2–12.

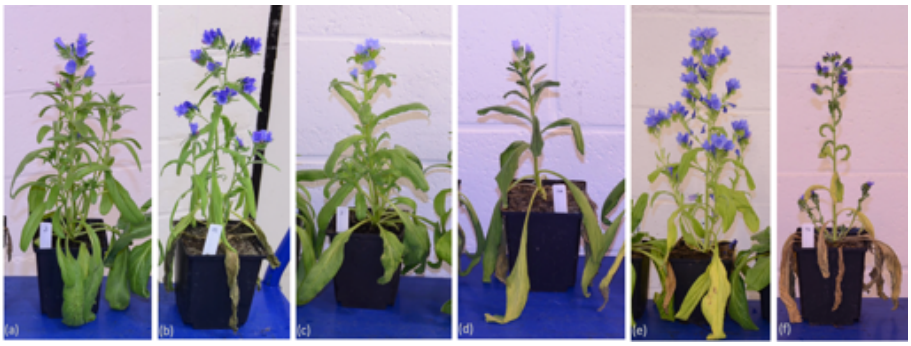


Figure II.12 : Plantes de *E. plantagineum* après 2 semaines de traitement en chambre de culture, suivant les différents traitements : (a) 21WW, (b) 21WS, (c) 24WW, (d) 24WS, (e) 27WW, (f) 27WS. 21=21°C ; 24=24°C ; 27=27°C ; WW = well-watered (arrosage régulier) ; WS = water-stressed (arrosage réduit, humidité du sol < 15%)

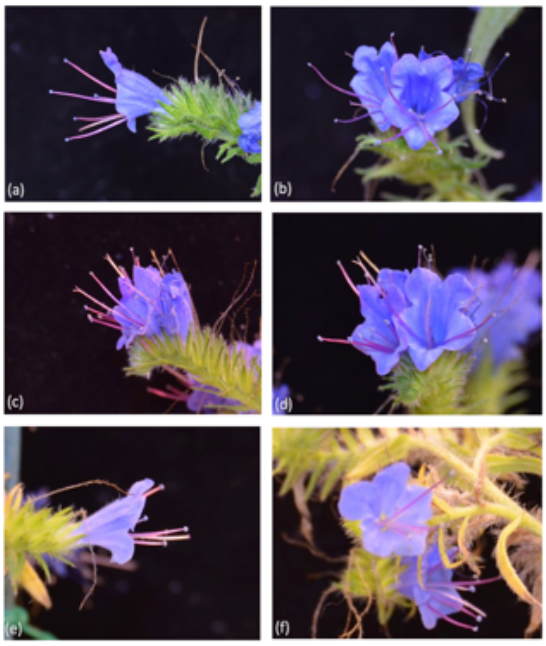


Figure II.13 : Fleurs de *E. vulgare* lors de la première expérience en 2015, après deux semaines de traitement. (a-b) 21WW, (c-d) 24WW, (e-f) 27WW. 21=21°C ; 24=24°C ; 27=27°C ; WW = well-watered (arrosage régulier).

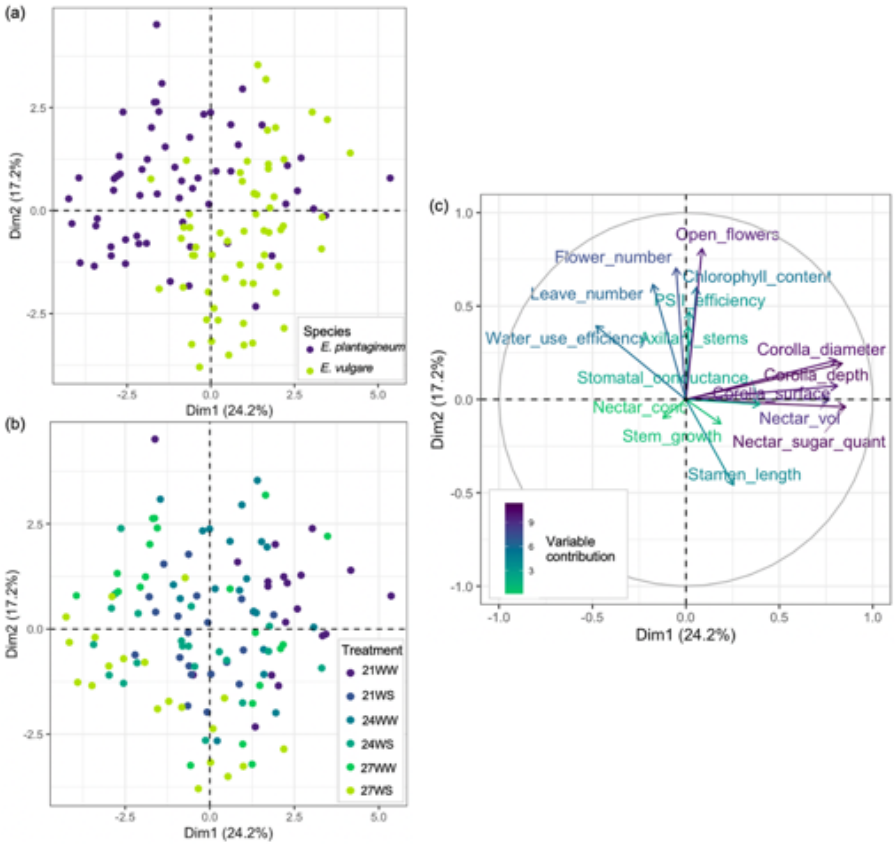


Figure II.14 : Analyse en composantes principales sur les variations relatives de l'ensemble des paramètres mesurés (morphologiques, physiologiques et floraux) par rapport au traitement contrôle (21WW) chez *E. plantagineum* et *E. vulgare*. (a) graphe des individus regroupés par espèce, (b) graphe des individus regroupés par traitement, (c) graphe des variables.

Chapter 4 : Growing and flowering in a changing climate: effects of higher temperatures and drought stress on the bee-pollinated species *Impatiens glandulifera* Royle

Ce chapitre 4 consacré à une de nos 4 espèces modèles, *Impatiens glandulifera* (Fig. II.15), décrit l'impact de la hausse de température et du stress hydrique sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux sur cette espèce. Ce chapitre a été publié.

Descamps, C.; Boubnan, N.; Jacquemart, A.-L. & Quinet, M. (2021) Growing and flowering in a changing climate: effects of higher temperatures and drought stress on the bee-pollinated species *Impatiens glandulifera* Royle. Plants, 10, 988.
https://doi.org/10.3390/plants10050988

Dans ce chapitre 4, nous abordons la réponse à la hausse de température et au stress hydrique de la 4ème espèce modèle, *Impatiens glandulifera*. Cette espèce, par rapport aux 3 autres, appartient à la famille des Balsaminaceae et se distingue par une production de ressources florales très abondantes. Elle a, par ailleurs, des exigences hydriques différentes ; le biotope de cette espèce correspond à des milieux humides voire inondés (berges de cours d'eau) comparé aux 3 autres espèces qui préfèrent les milieux mésophiles (*B. officinalis, E. plantagineum)* voire secs (*E. vulgare)*. Nous avons suivi le protocole décrit en introduction de la partie II, en complétant les mesures physiologiques avec un dosage des sucres solubles totaux dans les feuilles. Vu la production importante de pollen, nous avons aussi quantifié la teneur en polypeptides du pollen. Cette expérience a été réalisée en 2015 avec l'aide de Najet Boubnan (Master bioingénieur). Comparativement aux deux premiers chapitres, l'approche physiologique a été renforcée afin de mieux comprendre l'impact des stress sur la production et l'allocation des sucres et leur impact sur la production des ressources florales. Nous avons obtenu des résultats concernant les deux premières questions de recherche (Fig. II.16), afin de compléter la comparaison avec les autres espèces modèles. Notre hypothèse était que la combinaison d'une hausse de température et d'un stress hydrique affecterait la croissance de la plante ainsi que sa physiologie, diminuant le quantité et la qualité des ressources florales et modifiant les traits floraux de l'espèce. Nous avons abordé 2 questions à savoir : i) Est-ce que la combinaison de stress affecte la croissance, la physiologie, les traits floraux et les ressources florales des plantes ? ii) Est-ce que ces stress influencent les traits floraux et les ressources florales des plantes directement ou indirectement à travers un effet sur la croissance et la physiologie ?

Les apports de ce chapitre par rapport aux questions de recherche sont synthétisés ci-dessous.



Figure II.15 : Photos de *Impatiens glandulifera* : (a) plante entière (V. Cocquereaux, 2010) ; (b) fleur ouverte (A. Vervoort, 2011)



Figure II.16 : Schéma conceptuel de l'organisation des chapitres 2 à 6 de la thèse en fonction des thèmes explorés et des espèces modèles. L'encadré bleu correspond au chapitre d'intérêt.

1) Les impacts sur la morphologie, la physiologie et les traits floraux

De manière similaire aux 3 autres espèces, nous avons observé une sénescence foliaire provoquée par le stress hydrique. Par contre, contrairement aux 3 autres espèces, la teneur relative en chlorophylle des feuilles n'a pas été affectée par les stress. Le stress hydrique a cependant affecté d'autres paramètres de la phase photochimique de la photosynthèse, en diminuant l'efficience du photosysteme II, ainsi que le quenching photochimique. Le stress hydrique n'a pas influencé la conductance stomatique, mais celle-ci a été négativement impactée par la hausse de température. En outre, la teneur en sucres solubles totaux a été impactée par la hausse de température, cette teneur était maximale à 27°C, comparé à 21°C et 24°C et réduite pour les plantes en stress hydrique. Tout comme pour les 3 autres espèces, le stress hydrique a diminué d'une part, le nombre de fleurs par plante, au point qu'à 27°C, les plantes n'avaient quasiment plus de fleurs après deux semaines de stress et d'autre part, leur taille en réduisant la largeur des corolles de 25% (Fig. II.17 en annexe). La température a réduit la durée d'anthèse passant de 5-6 jours à 21°C et 24°C à 3 jours à 27°C.

2) Les impacts sur les quantités et composition des ressources florales

La température et le stress hydrique ont influencé négativement la production de nectar ; alors que seule la température a affecté la production de pollen. Le volume de nectar a été réduit par les stress (environ 14 µl à 21WW et 0.5 µl à 27WS) ainsi que les quantités de sucres contenus dans le nectar par fleur (environ 14.1 mg par fleur à 21WW et 0.6 mg par fleur à 27WS). Le nombre de grains de pollen était plus élevé à 24°C comparé à 21°C (nous n'avions pas assez d'échantillons pour faire les comptages à 27°C). La teneur en polypeptides du pollen, par contre, a diminué de 65% entre 21°C et 27°C.

Ce chapitre 4 clôture une première partie de la thèse visant à explorer la réponse de plusieurs espèces entomophiles à une combinaison de hausse de température et de stress hydrique. En particulier, comparativement aux deux espèces annuelles (*Borago officinalis* et *Echium plantagineum*), les paramètres végétatifs, physiologiques et reproducteurs de *I. glandulifera* ont été impactés soit par la hausse de température, soit par le stress hydrique mais rarement par les deux stress. Les traits floraux et ressources florales ont été nettement plus affectés par la hausse des températures.

Ces 3 chapitres nous ont permis de répondre à la première question de recherche concernant la réponse des plantes aux stress hydrique et thermique au niveau morphologie, physiologie et traits floraux, ainsi qu'au premier volet de la deuxième question de recherche concernant les modifications de quantités de ressources florales en réponse à ces stress.

Growing and flowering in a changing climate: effects of higher temperatures and drought stress on the bee-pollinated species *Impatiens glandulifera* Royle

Charlotte Descamps, Najet Boubnan, Muriel Quinet, Anne-Laure Jacquemart

Earth and Life Institute– Agronomy, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Correspondence : Charlotte Descamps, email: charlotte.descamps@uclouvain.be

Descamps, C.; Boubnan, N.; Jacquemart, A.-L. & Quinet, M. (2021) Growing and flowering in a changing climate: effects of higher temperatures and drought stress on the bee-pollinated species *Impatiens glandulifera* Royle. Plants, 10, 988.
https://doi.org/10.3390/plants10050988

Abstract

Drought and higher temperatures caused by climate change are common stress conditions affecting plant growth and development. The reproductive phase is particularly sensitive to stress, but plants also need to allocate their limited resources to produce floral traits and resources to attract pollinators. We investigated the physiological and floral consequences of abiotic stress during the flowering period of *Impatiens glandulifera*, a bee-pollinated species. Plants were exposed to three temperatures (21, 24, 27 °C) and two watering regimes (well-watered, water stress) for 3 weeks. Not all parameters measured responded in the same manner to drought and/or heat stress. Drought stress induced leaf senescence, decreasing leaf number by 15–30% depending on growth temperature. Drought also reduced photosynthetic output, while temperature rise affected stomatal conductance. The number of flowers produced dropped 40–90% in response to drought stress, while higher temperatures shortened flower life span. Both stresses affected floral traits, but flower resources diminished in response to higher temperatures, with lower nectar volume and pollen protein content. We conclude that increased temperatures and drought stress, which are becoming more frequent with climate change, can negatively affect flowering, even if plants deploy physiological resistance strategies.

Keywords : plant–pollinator interactions; water stress; drought; heat; abiotic stress; floral signals; nectar; pollen; floral rewards; bee-pollinated species

1. Introduction

Climate change is responsible for more frequent and unpredictable variation in daily and seasonal temperatures, as well as drought [1]. These consequences of a warming climate are detrimental to plants, especially when they co-occur [1–3]. In temperate regions, temperature rise and drought stresses are more likely to affect plants simultaneously during the Spring and Summer seasons, which are crucial periods for plant–pollinator interactions. Entomophilous plants attract pollinators with their floral traits and resources (nectar and pollen) to ensure pollination [4,5]. Bees rely exclusively on these floral resources as their food sources. The plant reproductive stage is particularly sensitive to higher temperatures and drought [6], which may severely disrupt plant–pollinator interactions by negatively affecting floral signals and resources [7,8].

Plants suffer from heat stress when temperatures exceed their optimal growing temperature, a condition often accompanied by drought stress [6,9]. These stressful conditions may impair vital physiological processes such as stomatal conductance, photosynthesis and respiration [2,10,11]. Co-occurrence of these two abiotic stresses initiates complex plant responses that cannot be deduced from single stress responses [12,13]. For example, heat and drought have conflicting effects on stomatal conductance. While plants close their stomata when faced with water stress, they open them at a higher temperature to maintain transpiration and leaf cooling [14]. In addition, closed stomata reduce CO_2 uptake and, thus, photosynthetic output [2,15]; photosystem II is susceptible to a rise in temperature, leading to lower photosynthesis during heat stress [16]. Growing in such challenging environments limits resources available for plant reproduction [17]. Although heat and drought stress negatively affect all plant developmental stages, the flowering period is particularly sensitive to abiotic stresses [18–20], which can result in fewer flowers, higher flower abortion rates and impaired flower development and fertility, leading to lower reproductive success [6,19].

During the flowering period, entomophilous plant species attract pollinators with floral traits (floral display, scent, color) and resources such as nectar and pollen [21]. These resources are crucial to bees, constituting their sole food sources. Nectar is a major sugar source, while pollen provides amino acids, proteins and lipids [22–24]. The volume and quality of these resources will contribute to flower attractiveness, as a high sugar content in nectar and a high polypeptide content in pollen are more attractive to pollinators compared to resources of lower quality or quantity [25–29], as well as bee development and survival [30–32]. The modifications of floral traits and floral resources stemming from higher temperatures and drought may, therefore, have dire consequences on plant–pollinator interactions. However, how water stress, rising temperatures and their combination affect floral traits and resources in entomophilous species has not been extensively investigated to date [7,33–35].

This study aimed to investigate the effects of higher temperatures and drought, individually and in combination, on the reproductive phase of the bee-pollinated species Himalayan balsam (*Impatiens glandulifera*, Balsaminaceae). *Impatiens glandulifera* was introduced from the Himalayas for horticulture purposes and is now one of the most invasive annuals in Europe [36]. It grows in areas with medium shade and requires soil moisture; it can grow on nutrient-rich to -poor soil [36]. We selected this plant as a model for its high floral resource production. Flowers of *I. glandulifera* are highly attractive to pollinators and produce large amounts of nectar and pollen (1.3×10^6 pollen grains and 7.3 μL of nectar per flower [36]). Although *I. glandulifera* could be considered as self-compatible, it shows low autonomous selfing and bees visit flowers up to 250 times during the flower life span [36]. Our hypothesis was that concomitant heat and drought stress would affect plant growth and physiology, decreasing the volume and quality of floral resources and modifying floral traits. We addressed the following questions: 1) Do concomitant temperature and water stresses affect plant growth, plant physiology, floral traits and resources? 2) Do these stresses influence floral traits and floral resources directly or indirectly by modulating plant growth and physiology?

2. Results

Plants were grown over their flowering period under two watering conditions (well-watered, WW, and water-stressed, WS) and three temperature regimes (21, 24, 27 °C), resulting in six treatments (21WW, 21WS, 24WW, 24WS, 27WW, 27WS).

2.1. Vegetative and physiological parameters

Drought stress decreased leaf number, while higher temperatures had no significant effect (Figure 1a, Table 1). Specific leaf area (SLA) varied with temperature, but not with soil water content (Figure 1b, Table 1), as plants grown at 21 and 24 °C had a higher mean SLA than plants grown at 27 °C.

We then determined the effects of both stresses on photosynthesis: chlorophyll content was not significantly affected by drought or rising temperatures (Figure 1c, Table 1). However, drought stress negatively affected the light phase of photosynthesis by lowering photosystem II efficiency and photochemical quenching (Figure 1e,f, Table 1). Soluble sugar content in leaves varied with both temperature and soil water moisture: leaves from plants grown at 27 °C accumulated more sugar compared to those grown at 21 or 24 °C, and sugar content decreased in plants subjected to drought, mainly at 24 °C (Figure 1d, Table 1). Finally, we assessed the influence of temperature and drought on gas exchange: stomatal conductance decreased at 27 °C compared to 21 and 24 °C but was not affected by drought (Figure 1g, Table 1). Leaf water content remained around 80% under all growth conditions (Figure 1h, Table 1).

Table 1. Statistical results of of the effects of an increase in temperature (Temp), water stress (Water), and their interaction (Temp * Water) on vegetative, physiological and floral traits and resources of *Impatiens glandulifera*. Significant differences are indicated in bold.

Parameters	Temp	Water	Temp * Water
Number of leaves	$F_{2,28} = 1.66$, $p = 0.21$	$F_{1,28} = 4.68$, $\mathbf{p = 0.04}$	$F_{2,28} = 0.24$, $p = 0.79$
Specific leaf area	$F_{2,24} = 5.05$, $\mathbf{p = 0.01}$	$F_{1,24} = 2.15$, $p = 0.16$	$F_{2,24} = 1.39$, $p = 0.27$
Chlorophyll content	$F_{2,22} = 1.42$, $p = 0.16$	$F_{1,22} = 0.05$, $p = 0.83$	$F_{2,20} = 0.25$, $p = 0.78$
Photosystem II efficiency	$F_{2,23} = 2.17$, $p = 0.14$	$F_{1,23} = 11.94$, $\mathbf{p = 0.002}$	$F_{2,23} = 0.69$, $p = 0.51$
Photochemical quenching	$F_{2,23} = 0.06$, $p = 0.95$	$F_{1,23} = 14.14$, $\mathbf{p = 0.001}$	$F_{2,23} = 0.22$, $p = 0.80$
Leaf sugar concentration	$F_{2,12} = 22.31$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,12} = 7.99$, $\mathbf{p = 0.02}$	$F_{2,12} = 1.31$, $p = 0.31$
Stomatal conductance	$F_{2,19} = 20.08$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,19} = 2.51$, $p = 0.13$	$F_{2,19} = 0.67$, $p = 0.67$
Leaf water content	$F_{2,24} = 2.97$, $p = 0.07$	$F_{1,24} = 1.22$, $p = 0.28$	$F_{2,24} = 1.06$, $p = 0.36$
Number of flowers	$F_{2,28} = 1.08$, $p = 0.35$	$F_{1,28} = 14.98$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,28} = 3.16$, $p = 0.06$
Anthesis duration	$F_{2,12} = 22.29$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,12} = 0.14$, $p = 0.71$	$F_{2,12} = 0.57$, $p = 0.58$
Corolla width	$F_{2,24} = 3.27$, $p = 0.06$	$F_{1,24} = 4.85$, $\mathbf{p = 0.04}$	$F_{2,24} = 0.42$, $p = 0.66$
Corolla depth	$F_{2,24} = 10.54$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,24} = 0.28$, $p = 0.60$	$F_{2,24} = 0.21$, $p = 0.82$
Nectar volume	$F_{2,19} = 33.02$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,19} = 23.79$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{2,19} = 3.51$, $p = 0.05$
Nectar sugar concentration	$F_{2,19} = 3.63$, $\mathbf{p = 0.04}$	$F_{1,19} = 0.10$, $p = 0.75$	$F_{2,19} = 2.96$, $p = 0.08$
Number of pollen grains[1]	$F_{2,36} = 28.41$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,36} = 1.37$, $p = 0.25$	$F_{2,36} = 1.42$, $p = 0.24$
Polypeptide concentration	$F_{2,16} = 11.01$, $\mathbf{p < 0.001}$	$F_{1,66} = 2.33$, $p = 0.15$	$F_{2,16} = 21.07$, $p = 0.84$

[1]without 27WW, 27WS

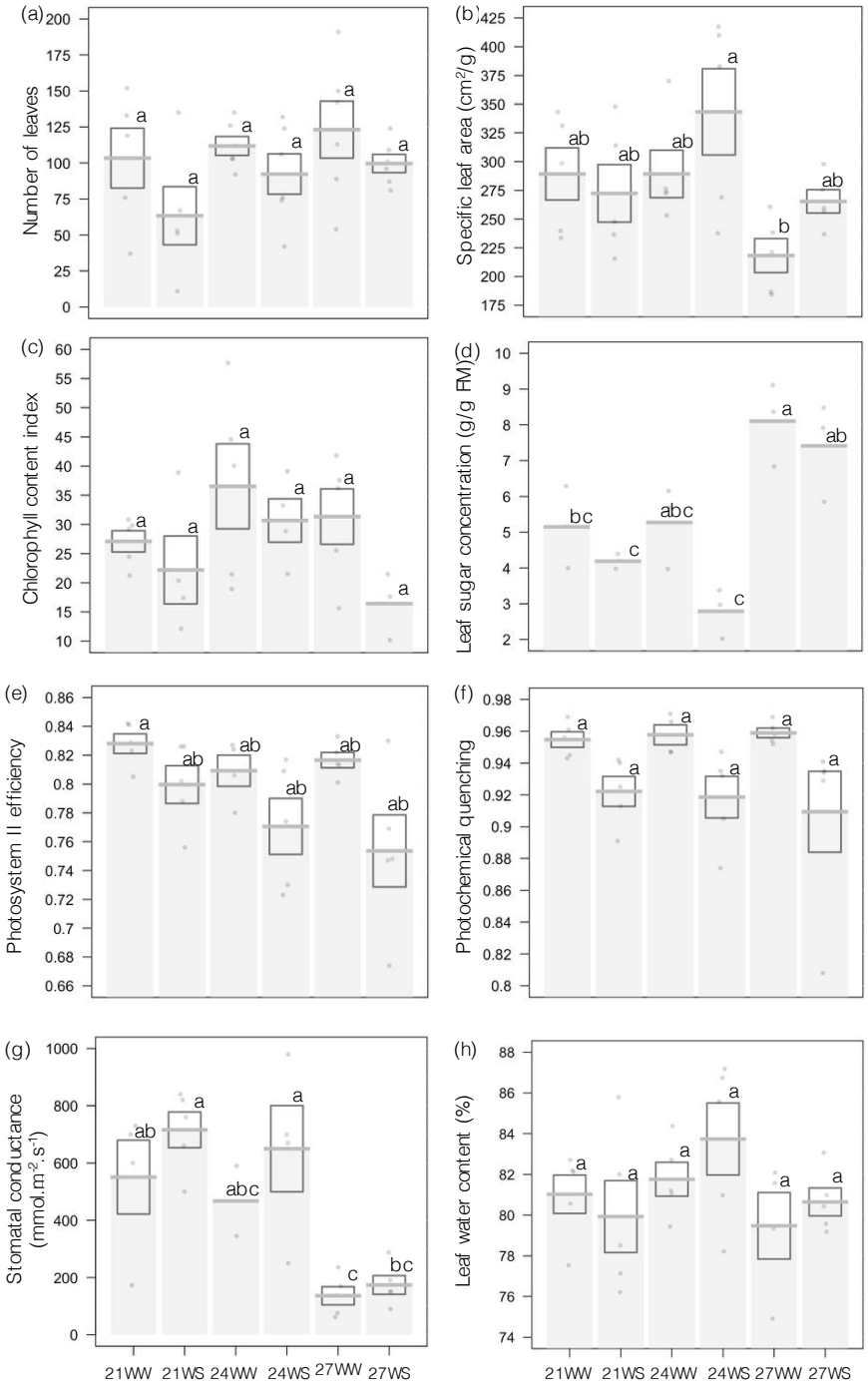


Figure 1. Effects of increasing temperatures and water stress on vegetative and physiological parameters of *Impatiens glandulifera* plants 2 weeks after beginning treatment. (a) Number of leaves, (b) specific leaf area, (c) chlorophyll content index, (d) leaf sugar concentration, (e) photosystem II efficiency, (f) photochemical quenching, (g) stomatal conductance and (h) leaf water content. N =

5 per treatment, except for leaf sugar content, with N = 3. Data are presented as means ± standard errors (SE) as barplots, with individual data points shown in gray. Treatments followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$ 21, 21 °C; 24, 24 °C; 27, 27 °C; WS, water-stressed; WW, well-watered. 21WW = control.

2.2. Floral traits and resources

Drought stress resulted in fewer flowers being produced, especially at 27 °C (Figure 2a, Table 1); plants exposed to the 27WS treatment had almost no flowers after the 2-week treatment. Furthermore, higher temperatures shortened the duration of flower anthesis, while soil water moisture did not contribute significantly (Figure 1b, Table 1). Flowers remained open for only 3 days when subjected to 27 °C, but a full 5–6 days when grown at 21 and 24 °C (Figure 2b, Table 1). Drought stress modified flower shape by diminishing corolla width by 25% at 27WS compared to 21WW (Figure 2c, Table 1). Higher temperatures reduced corolla depth by 15% at 24 and 27 °C relative to growth at 21 °C, under both well-watered and drought conditions (Figure 2d, Table 1).

The volume and quality of floral resources produced were mainly affected by the rise in temperature (Table 1). Nectar volume dropped drastically in response to both drought stress and higher temperatures, reaching 14 μL per flower grown at 21WW but only 0.5 μL per flower grown at 27WS (Figure 2e, Table 1). By contrast, the sugar concentration of nectar remained fairly constant and decreased markedly only in 27WW flowers to 56 °Brix relative to 72 °Brix in 21WW flowers (Figure 2f, Table 1). Higher temperatures and drought stress lowered the sugar content in nectar per flower from 14.1 ± 1.8 mg at 21WW to 0.6 ± 0.1 mg at 27WS. Another measure of the quantity of floral resources, the number of pollen grains per flower, increased when grown at 24 °C compared to 21 °C under both well-watered and drought conditions (Figure 2g, Table 1). Many anthers were empty when plants were grown at 27 °C, preventing us from scoring pollen grains under these conditions. Instead, we used these precious and limited pollen samples collected at 27 °C to determine polypeptide content, another proxy of pollen quality. We observed that polypeptide content was negatively affected by higher temperatures but not by drought (Figure 2 h, Table 1), with polypeptide content decreasing by 65% between the 21WW and 27WS treatments.

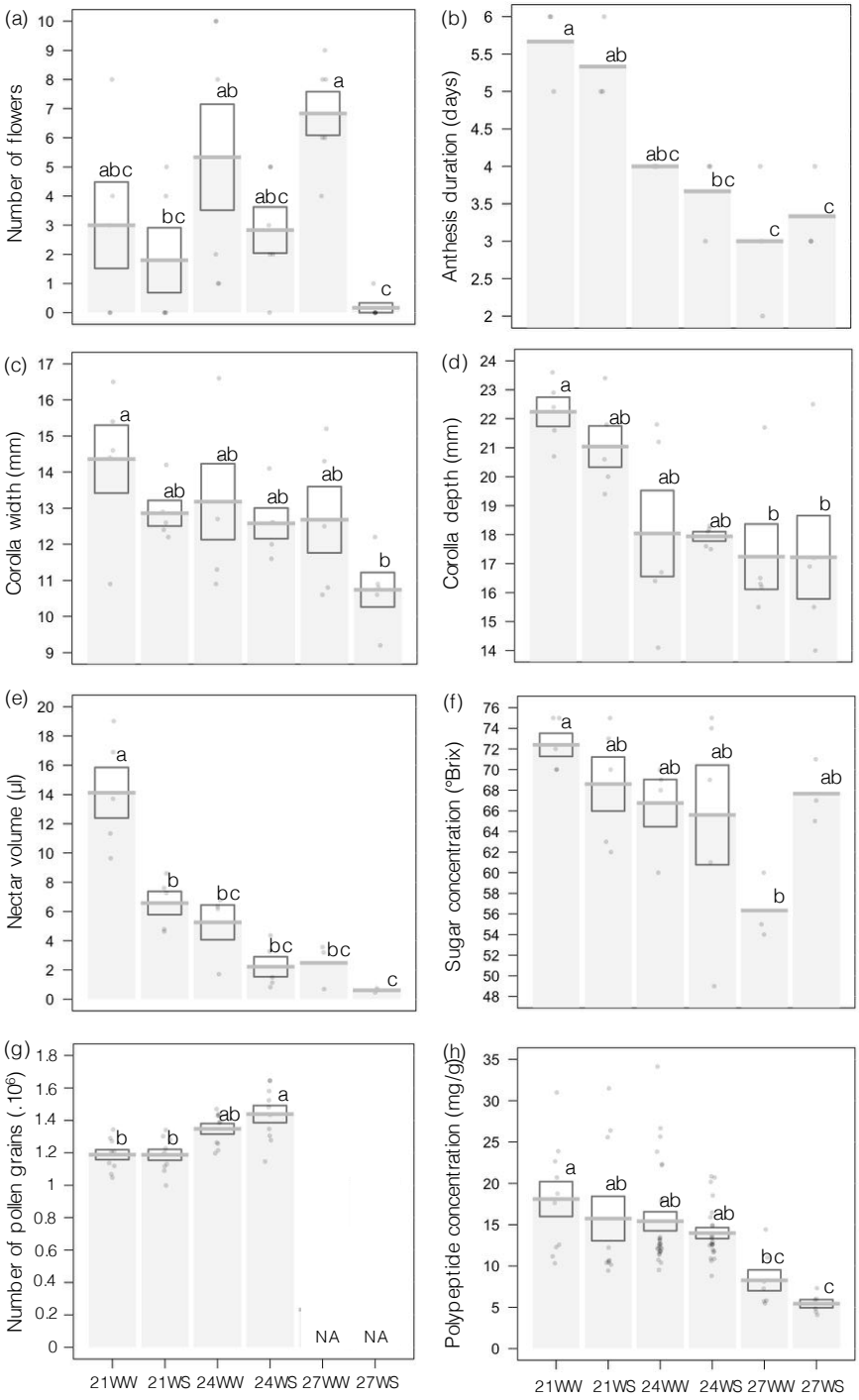


Figure 2. Effects of increasing temperature and water stress on floral traits and resources of *Impatiens glandulifera* plants 2 weeks after beginning treatment. (**a**) Number of flowers per plant, (**b**) anthesis duration per flower, (**c**) corolla width, (**d**) corolla depth, (**e**) nectar volume per flower, (**f**)

sugar concentration in nectar, (**g**) number of pollen grains per flower and (**h**) polypeptide concentration in pollen. N = 5 per treatment, except for number of pollen grains and polypeptide content, with N = 10. Data are presented as means ± standard errors (SE) as barplots with individual data points shown in gray. Treatments followed by different letters are significantly different at $p < 0.05$. 21, 21 °C; 24, 24 °C; 27, 27 °C; WS, water-stressed; WW, well-watered. 21WW = control.

2.3. Principal component analysis

We performed a principal component analysis of all phenotypic values collected in this study. The first two principal components explained 78.6% of the observed variance (Figure 3). Axis 1 largely separated samples by their temperature treatments (21, 24 vs. 27 °C, Figure 3a) and as a function of their underlying physiology (stomatal conductance, leaf sugar content) and floral resources (polypeptide content) (Figure 3b). Axis 2 discriminated samples based on their water status, with a strong contribution from the number of flowers produced per plant and photochemical quenching values. In particular, plants grown in the 27WS and 27WW treatments clustered away from all other treatments, highlighting the high level of stress associated with these growth conditions.

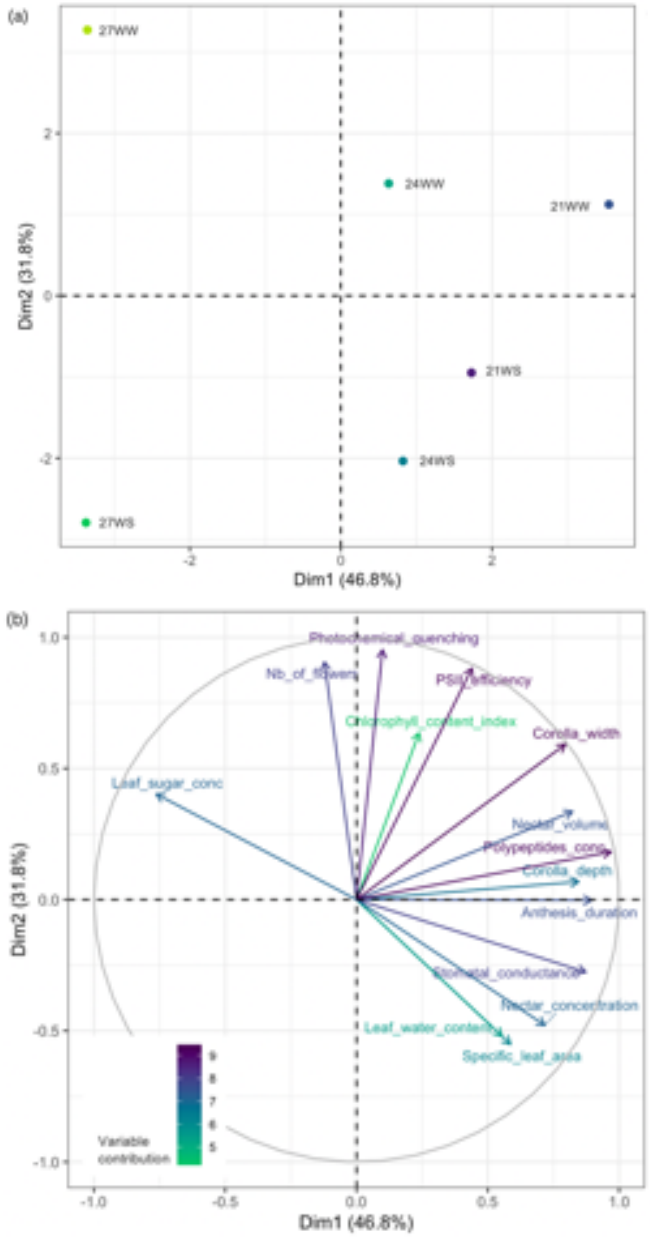


Figure 3 : Principal component analysis (PCA) of vegetative, physiological and floral traits and resources of *Impatiens glandulifera* plants grown under three temperatures (21, 24, 27 °C) and two watering regimes (WW, well-watered; WS, water stressed) for 2 weeks. (**a**) Individual graph showing the different treatments; (**b**) variable graph of PCA showing vegetative , physiological, floral traits and floral reward parameters. conc = concentration, PSII = photosystem II. 21, 21 °C; 24, 24 °C; 27, 27 °C; WS, water-stressed; WW, well-watered. 21WW = control.

3. Discussion

Higher temperatures and drought stress affected physiological traits as well as floral traits and resources in the entomophilous species *I. glandulifera*. However, not all parameters responded in the same direction to a rise in temperature or to drought, alone or in combination. Drought stress affected leaf number and the light phase of photosynthesis, while higher temperatures targeted leaf size and stomatal conductance. We observed distinct effects of each stress on the reproductive phase, as drought stress reduced the number of flowers produced, while higher temperatures shortened flower life span. Both stresses influenced floral traits; floral resources were themselves mainly affected by higher temperatures. Plant growth and development can be differently affected by heat and drought stresses [6,37], and plants exhibiting resistance to one stress are not always resistant to other stresses or to their combination [10,38,39], highlighting the importance of considering combinations of stresses when attempting to predict plant responses to climate change. Our results demonstrated that plants exposed to both high temperatures of 27 °C and drought stress (27WS) were more stressed relative to those exposed to all other growth conditions tested here.

Drought stress reduced the number of leaves by 15–30% depending on the growth temperature, a common consequence of water stress observed in multiple plant species [9,40–42]. Leaf senescence is induced by the phytohormone ethylene, whose biosynthesis is stimulated by drought [43]. By reducing the number of leaves, the plant decreases its transpiration surface and so its need for water [44]. However, this strategy also leads to a lower total photosynthetic output, resulting in decreased carbohydrate production, which affects yield for many crop species [45,46]. Furthermore, we observed that water stress negatively affected the light phase of photosynthesis. Although chlorophyll content remained constant across all treatments, photosystem II efficiency and photochemical quenching were both reduced in plants experiencing drought. As a result, some of the energy captured by the photosystems was dissipated without being used for photosynthesis, and a great number of the reaction centers of the photosystems were closed under water stress, making them unavailable to capture light [47]. Impairing the photosynthetic apparatus is a major effect of drought [48] that leads to diminished photosynthesis and carbohydrate production. Faced with drought stress, most plants close their stomata to decrease leaf transpiration [46,49,50]. We noticed no effect on stomatal conductance in response to drought in our experimental conditions, however. Stomatal responses vary greatly between plant species [51]. For example, drought did not affect stomatal conductance in other species such as Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) and starflower (*Borago officinalis*) [12,52]. Leaf water content remained constant between well-watered and drought-stressed plants and specific leaf area was neither affected by water stress. This suggests either that I. *glandulifera* has developed mechanisms to limit water loss or that the stress was not severe to the point of reducing these

parameters. Moreover, it cannot be excluded that the constant high relative humidity (80%) in the growth room limited the water stress at the leaf level and partly explained the stability of leaf water content, leaf area and stomatal conductance. In accordance with the decrease in photosynthesis, we observed a lower concentration of soluble sugars in the leaves in response to water stress. By decreasing photosynthetic rate and sugar production, water stress limited the resources available for flower development and plant reproduction.

I. glandulifera plants were relatively tolerant to higher temperatures during their vegetative phase, as only physiological parameters such as SLA and stomatal conductance were lower at 27 °C. As higher temperatures did not affect leaf water content, reduced SLA is most likely attributable to a reduction in leaf size, which has been reported under similar conditions in other plant species [52]. In agreement, cell elongation becomes impaired when temperatures exceed the optimum for plant growth [53]. In contrast to drought stress, the light phase of photosynthesis was not affected by higher temperatures in our study, although other studies showed that chlorophyll biosynthesis and light phase of photosynthesis are sensitive to heat in several plant species [46]. Such a discrepancy might be explained by the fact that a temperature of 27 °C may induce only a moderate stress in *I. glandulifera.* Similarly, Zhou et al. [13] reported that drought stress was a more potent inhibitor of the light-dependent phase of photosynthesis than higher temperatures in tomato (*Solanum lycopersicum*). However, our results showed that gas exchange, which modulates photosynthetic capacity, responded to higher temperatures in *I. glandulifera*. Stomatal conductance decreased at 27 °C, suggesting that the plants closed their stomata. By closing their stomata, plants reduce CO_2 uptake, which can lead to a decrease in sugar synthesis by affecting the light independent phase of photosynthesis [54,55]. On the contrary, total soluble sugar concentrations increased in leaves grown at 27 °C compared to those grown at 21 or 24 °C but might reflect the smaller size of leaves grown at 27 °C. A similar response in the leaf concentration of soluble sugars has been noted in response to abiotic stress in other plant species [56]. Soluble sugars may also be used as osmolytes to maintain cell turgor by forming a concentration gradient to counteract water loss from the higher temperatures [57–59]. In response to abiotic stress, carbohydrates might become mobilized to mount cost-effective resistance mechanisms to the detriment of plant growth [59]. Limited sucrose export to sink organs will ultimately limit reproductive development [17,48]. Consistent with this notion, Ghanem et al. [56] indeed observed that although the concentration of soluble sugars was reported to increase in tomato leaves in response to abiotic stress, it decreased in inflorescences. They explained the failure of inflorescence development due to altered source–sink relationships [56].

In addition to affecting plant physiology and leaf sugar concentrations, drought stress and higher temperatures also influenced flower production, floral traits and floral resources in *I. glandulifera*. We observed damage to reproductive organs at 24 °C, indicating that the optimum temperature for reproductive growth is lower than for vegetative growth, as previously reported in several species [12,19]. The reproductive phase is typically more sensitive to abiotic stress than the vegetative phase of plant

development [6,19]. Drought stress reduced the number of flowers per plant by 50% at 21 and 24 °C and by close to 100% at 27 °C, in agreement with previous reports [35,60,61]. By contrast, flower production remained unaffected by higher temperatures, although heat stress has been reported to reduce the number of flowers in several species [62,63]. However, higher temperatures did shorten the life span of flowers, an effect that was not observed in the context of drought stress. A shorter anthesis period may reduce the reproductive success of the flower. In addition, both drought stress and heat stress modified flower size, with the temperature reducing corolla depth and drought stress making the corolla narrower. Corolla size shows high plasticity in response to abiotic stress for annual species [64]. Maintaining large flowers with a long life span comes at a cost for plants [65,66]. One possible explanation for the negative influence of abiotic stresses on flower production and development may involve the investment of carbohydrates into resistance mechanisms at the expense of reproductive growth [17,56]. Floral organs continuously draw on resources to avoid reproductive failure under any growth condition, but perhaps even more so under abiotic stress when photosynthates might be in short supply [67–69]. The proper development of reproductive structures relies on the import of photoassimilates from leaves through the phloem [70]. When the capacity of reproductive organs to import and use assimilates is disturbed by abiotic stress, it leads to higher rates of fruit and seed abortion [48]. Moreover, abiotic stress may change the guild of pollinators attracted to flowers, as their corollas become smaller [71], and may even result in a morphological mismatch between flower size and that of the pollinator in severely stunted corollas [33,72]. The number of flowers per plant and their size largely contribute to the floral display plants use to attract pollinators [73,74]. A less conspicuous floral display may change pollinator behavior (e.g., by reducing the visitation rate or pollen deposition rate), with adverse consequences for plant reproduction [35].

Floral resources such as the amount of nectar produced were strongly reduced by higher temperatures and drought stress; many flowers grown at 27 °C had no nectar, although *I. glandulifera* is known for its high nectar production [36]. Abiotic stresses often significantly decrease nectar volume per flower [75,76]. Furthermore, the concentration of sugars in nectar was lower at 27 °C. Sugar concentration in nectar is typically less sensitive to abiotic stresses than nectar volume [35,75,77]; sugar concentration can remain unchanged in nectar even under stress [63,78]. However, annual species appear to be more sensitive to higher temperatures for floral resource production, as we previously observed a decrease in sugar concentration for salvation jane (*Echium plantagineum*) in a similar experiment [64]. Despite the higher sugar concentration measured in leaves at 27 °C, sugar content in fact decreased in nectar of the same plants. Again, soluble sugars may be used preferentially for vegetative organs rather than reproductive tissues, suggesting that assimilate partitioning between vegetative and reproductive organs is modified by abiotic stress [17]. Lower nectar production would also affect pollinator behavior. *Impatiens glandulifera* is highly attractive to bumblebees and honeybees due to its high nectar production [36], and nectar is the main source of sugar for these pollinators [22]. Less nectar production due to higher temperatures and drought stresses affect pollinator visitation rates and, thus, the reproductive success of the plant

[63,76,79]. This could lead to affecting the invasiveness of *I. glandulifera,* since the invasive strategy of this species is based on high reproductive success [36,80].

Impatiens glandulifera also produce large amounts of pollen [36]. In our experiment, pollen production was higher at 24 °C than at 21 °C, while most anthers were empty at 27 °C. The number of pollen grains is determined very early during floral morphogenesis [81], and microsporogenesis is the most sensitive to abiotic stress [82–84]. Higher temperatures and drought stress reduce pollen quantity and viability [12], although viability was not investigated here. By contrast, protein concentration decreased in pollen with higher temperature, indicative of lower pollen quality. To the best of our knowledge, only one other recent study investigated the effect of higher temperatures on pollen quality but did not reveal a decrease in protein concentration [85]. Pollen protein content is a key parameter for both plant reproductive success and insect pollinator health. From the plant perspective, lower protein content in the pollen has been linked to a decrease in pollen viability [86]. Pollen grain maturation is a stress-sensitive process in many plant species [82,87]. Temperature rise reduces starch concentration in developing pollen grains, causing failures in their development [88,89]. This could be explained by the disruption in resource allocation to reproductive organs due to abiotic stresses, as previously mentioned. From the side of the pollinator, bees rely exclusively on floral resources for food and feed on pollen as their sole source of proteins, amino acids and sterols. The chemical composition of pollen can influence insect visitation behavior [28,30,86,90]. Furthermore, foraging pollen with low quality (i.e., reduced protein content) will affect the survival of larvae as well as adult survival and reproduction [31]. Thus, the production of little pollen of low quality due to higher temperatures and drought stress will directly affect both plant reproductive success and pollinator visits.

In conclusion, our results show that higher temperatures and drought stress negatively but differently influence physiological traits, floral traits and floral resources in the entomophilous species *I. glandulifera.* While plants attempt to adjust and maintain their physiological processes to support their survival in response to outside stressors, the resulting reallocation of resources will have negative consequences on reproductive organs. The combination of higher temperatures and drought stress was particularly deleterious during flowering. For entomophilous plants, this stage is critical, as they need to attract pollinating insects, some of which depend exclusively on their floral resources as food sources. The observed reduction in flower production, flower size and volume and quality of floral resources will directly affect plant–pollinator interactions, with negative consequences for both partners, although these aspects remain to be investigated.

4. Material and methods

4.1. Plants and growth condition

Himalayan balsam (*Impatiens glandulifera*) is an annual, entomophilous plant with large zygomorphic pink flowers that originated from the Himalayas and has spread worldwide as an ornamental. *Impatiens glandulifera* is one of the most invasive annual species in the world [91]. It has spread in the majority of temperate communities in Europe, growing in riparian biotopes and in other disturbed sites with good water and nutrient supply [36,80]. It is now considered as one of the 100 worst invasive species in Europe [36,80]. The stem stands erect and grows to 1–2 m in height, with lanceolate leaves. The lower sepal gradually contracts into a nectar spur. Stamens are fused by their anthers and form a brush that covers the stigma [92]. This species produces copious floral resources (~1.3 × 10^6 pollen grains and 7.3 µL of nectar with 52% as sugars per flower [36]). *Impatiens glandulifera* flowers are, thus, very attractive to pollinators, each receiving up to 250 insect visits over their life span [36].

Impatiens glandulifera seedlings were collected from populations in Belgium (Court-Saint-Etienne, N 50°38'39" N 4°34'6" E and Jamioulx, 50°21'10" N, 4°24'45" E). Seedlings were transferred to 5 L pots containing universal peat compost (DCM, Amsterdam, Netherlands) and grown in the glasshouse at the University campus (Louvain-la-Neuve 50°39'58" N; 4°37'9" E, Belgium). Plants were watered daily with rainwater until the beginning of the experiment.

Plants received treatments at the beginning of their reproductive stage, when bolting occurs, flowering stems develop, and the first flowering buds become visible. Plants were exposed to three growth temperatures (21, 24 and 27 °C) and two watering regimes (well-watered, WW vs. water stress, WS) to investigate the effects of increasing temperature and water stress, individually and in combination, on plant growth and floral traits and resources. These conditions correspond to those encountered during the flowering period of the plant in Belgium and to temperatures expected in the context of climate change predictions. In total, 60 plants (10 plants per treatment) were subjected to one of six treatments: 21 °C well-watered (21WW), 21 °C water-stressed (21WS), 24 °C well-watered (24WW), 24 °C water-stressed (24WS), 27 °C well-watered (27WW) and 27 °C water-stressed (27WS); 21WW was considered as control condition based on the growing conditions encountered by *I. glandulifera* naturally in Belgium. Plants were transferred to growth chambers set to the following temperature cycles (day/night): 21 °C/19°C, 24 °C/22°C and 27 °C/25°C. Plants were grown in a long-day photoperiod (16 h light:8 h darkness), and relative humidity was maintained at 80 ± 10%. Illumination was provided by Philips HPIT 400 W lamps (Philips Lighting S.A., Brussels, Belgium), to a light intensity of 155 ± 20 µmol m^{-2} s^{-1} at canopy level (Skye Instruments Quantum Sensor quantum meter; Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Each growth chamber housed the two watering regimes for each experimental temperature. The well-watered plants were watered daily (soil humidity ~50%), while the water-stressed plants were watered twice a week (soil humidity <30%). Water stress started after 1 week of acclimation to the growth chambers (this week was considered week 0). All measurements were taken 2 weeks after the beginning of water stress.

4.2. Vegetative and physiological parameters

The number of photosynthetically active leaves was assessed from five plants per treatment.

Physiological measurements were performed on the fifth youngest leaf (counted from the shoot apex) of five plants for each treatment, between 10 am and 3 pm. Chlorophyll fluorescence was monitored using a pulse-modulated fluorimeter (FMS II; Hansatech Instruments, Norfolk, UK). The collected parameters were photosystem II (PSII) efficiency (ΦPSII), which measures the proportion of light absorbed by PSII used in photochemistry, and qP, which indicates the proportion of PSII reaction centers that are open [47]. Leaf were dark-adapted for 30 min before illumination with a first pulse of 18,000 mmol $m^{-2}s^{-1}$ followed by constant illumination with actinic light (660 mmol m^{-2} s^{-1}) for 2 min. The leaves were then exposed to a second saturating pulse of 18,000 mmol m^{-2} s^{-1}. Chlorophyll content index (CCI) was measured using a chlorophyll meter (Opti-Sciences, CCM-200), with the measurement taken three times on the same leaf. An automatic porometer (AP4 System, Delta-T Devices) was used to measure conductance g_s on the abaxial leaf surface.

Specific leaf area (SLA) was determined for five plants per treatment from their fifth youngest leaf (counted from the shoot apex). Leaves were weighed to obtain fresh mass (FW), and their surface area estimated from a leaf scan using ImageJ software [93]. Leaves were then dried at 70 °C for 2 days and weighed again to determine dry mass (DM). SLA was calculated as the ratio of leaf area to leaf DM. Leaf water content (WC) was calculated as WC = [(FW-DM)/FW].

Sugar concentration was determined for photosynthetically active leaves from three plants per treatment. For sugar extraction, 0.8 g of frozen leaves was ground to a fine powder in liquid nitrogen, and free soluble sugars were extracted with 7 mL of 70% ethanol. The extracts were then centrifuged for 10 min at 8000 g at 15 °C. Total soluble sugars in the supernatant were quantified spectrophotometrically using the anthrone reagent method according to Yemm and Willis [94]; the resulting sugar concentration was expressed as milligrams sugars per gram of leaf FW.

4.3. Measurements of floral traits and resources

The number of open flowers per plant was counted for five plants per treatment. For five flowers per treatment, corolla depth was measured as the length of the lower sepal.

Nectar was extracted with 10 µL glass capillary tubes (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) from five flowers per treatment. Nectar extractions were performed on flowers at the same developmental stage in the afternoon in order to collect the daily nectar production. Total sugar concentration of nectar (C, g sucrose/100

g solution) was measured with a low-volume hand refractometer (Eclipse handheld refractometer; Bel-lingham and Stanley, Tunbridge Wells, UK).

The anther brushes were collected from ten randomly selected flower buds per treatment, 1 day before anthesis, and stored in FAA solution (70% ethanol, glacial acid acetic, 35% formaldehyde; 18:1:1). To count the number of pollen grains, each brush was crushed separately and placed in microfuge tubes containing 50 µL Alexander stain [95]. Tubes were then vortexed to disperse pollen grains in the solution. A subsample of 1 µL was used to count pollen grains on a microscope slide under a light microscope (Nikon Eclipse E400, G 400×). Counts were performed in triplicate for each stylar brush. Polypeptide content (molecular weight >10 kDa) of pollen was determined from 5 mg of dry pollen in triplicate for each treatment following the method described in Vanderplanck et al. [96]. Total polypeptides were quantified using the bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific), with bovine serum albumin (BSA) as standard.

4.4. Statistical analyses

Normality of the data was estimated using QQ plots. Linear mixed models and analysis of variance (type II) were performed to a significance level of $p < 0.05$ to evaluate the effects of temperature increase, water stress and their interaction. For repeated measurements on the same plant at one time point (chlorophyll concentration, polypeptide concentration), linear mixed models were used with two fixed factors and their interaction (temperature × water) and plants as the repeated factor. Tukey's HSD test was performed for post hoc analyses. To obtain a global view of the influence of rising temperature and water stress on all parameters, a principal component analysis (PCA) was performed. All analyses were performed in R 3.6.1 [97], using the packages *car* for F test, *lme4* for linear mixed models, *Factomine*R for PCA, *ggplot2* and *yarr* for plots. Data are presented as means ± standard errors (SE).

Acknowledgments
We thank C. Buyens for technical assistance and Plant Editors for language editing. This work is a part of a Ph.D. (C. Descamps) and a masters (N. Boubnan) thesis.

Author contribution
Conceptualization, C.D., M.Q and A.-L.J.; methodology, C.D., M.Q and A.-L.J.; software, C.D.; validation, M.Q., A.-L.J.; formal analysis, C.D., N.B.; investigation, C.D., N.B.; resources, M.Q and A.-L.J.; data curation, C.D.; writing—original draft preparation, C.D., M.Q.; writing—review and editing, M.Q., A.-L.J.; visualization, C.D.; supervision, M.Q. and A.-L.J; funding acquisition, A.-L.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript revised the draft manuscript and read and approved the final manuscript.
Funding: This research received no external funding
Institutional Review Board Statement: Not applicable
Informed Consent Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the text. The data presented in this study are available on request from the corresponding author
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

5. References

1. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) *Global Warming of 1.5°C, an IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5°C Above Pre-Industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways, in the Context of Strengthening the Global Response to the Threat of Climate Change, Sustainable Development, and efForts to Eradicate Poverty*; IPCC ; Geneva, Switzerland, 2018.
2. Barnabás, B.; Jäger, K.; Fehér, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* **2008**, *31*, 11–38, doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x.
3. Spinoni, J.; Vogt, J.V.; Naumann, G.; Barbosa, P.; Dosio, A. Will drought events become more frequent and severe in Europe? *Int. J. Climatol.* **2018**, *38*, 1718–1736, doi:10.1002/joc.5291.
4. Latty, T.; Trueblood, J.S. How do insects choose flowers? A review of multi-attribute flower choice and decoy effects in flower-visiting Insects. *J. Anim. Ecol.* **2020**, *89*, 2750–2762, doi:10.1111/1365-2656.13347.
5. Schiestl, F.P. Ecology and evolution of floral volatile-mediated information transfer in plants. *New Phytol.* **2015**, *206*, 571–577, doi:10.1111/nph.13243.
6. Cohen, I.; Zandalinas, S.I.; Huck, C.; Fritschi, F.B.; Mittler, R. Meta-analysis of drought and heat stress combination impact on crop yield and yield components. *Physiol. Plant.* **2021**, *171*, 66–76, doi:10.1111/ppl.13203.
7. Forrest, J.R.K. Insect pollinators and climate change. In *Global Climate Change and Terrestrial Invertebrates*; John Wiley & Sons ; Ltd; 2016; pp. 71–91, ISBN 978-1-119-07089-4.
8. Ogilvie, J.E.; Griffin, S.R.; Gezon, Z.J.; Inouye, B.D.; Underwood, N.; Inouye, D.W.; Irwin, R.E. Interannual bumble bee abundance is driven by indirect climate effects on floral resource phenology. *Ecol. Lett.* **2017**, *20*, 1507–1515, doi:10.1111/ele.12854.
9. Prasad, P.V.V.; Staggenborg, S.A.; Ristic, Z. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop

plants. In *Response of Crops tFo Limited Water: Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth Processes*; 2008; pp. 301–355, doi:10.2134/advagricsystmodel1.c11.

10. Pandey, P.; Ramegowda, V.; Senthil-Kumar, M. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: Physiological and molecular mechanisms. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 723, doi:10.3389/fpls.2015.00723.
11. Rizhsky, L.; Liang, H.; Mittler, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1143–1151, doi:10.1104/pp.006858.
12. Descamps, C.; Quinet, M.; Baijot, A.; Jacquemart, A.-L. Temperature and water stress affect plant–pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 3443–3456, doi:10.1002/ece3.3914.
13. Zhou, R.; Kong, L.; Wu, Z.; Rosenqvist, E.; Wang, Y.; Zhao, L.; Zhao, T.; Ottosen, C.-O. Physiological response of tomatoes at drought, heat and their combination followed by recovery. *Physiol. Plant.* **2019**, *165*, 144–154, doi:10.1111/ppl.12764.
14. Rizhsky, L.; Liang, H.; Shuman, J.; Shulaev, V.; Davletova, S.; Mittler, R. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1683–1696, doi:10.1104/pp.103.033431.
15. Prasch, C.M.; Sonnewald, U. Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environ. Exp. Bot.* **2015**, *114*, 4–14, doi:10.1016/j.envexpbot.2014.06.020.
16. Prasad, P.V.V.; Boote, K.J.; Allen Jr, L.H. Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agric. For. Meteorol.* **2006**, *139*, 237–251, doi:10.1016/j.agrformet.2006.07.003.
17. Lemoine, R.; Camera, S.L.; Atanassova, R.; Dédaldéchamp, F.; Allario, T.; Pourtau, N.; Bonnemain, J.-L.; Laloi, M.; Coutos-Thévenot, P.; Maurousset, L.; et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, doi:10.3389/fpls.2013.00272.

18. Scheepens, J.F.; Deng, Y.; Bossdorf, O. Phenotypic plasticity in response to temperature fluctuations is genetically variable, and relates to climatic variability of origin, in *Arabidopsis Thaliana*. *AoB Plants* **2018**, *10*, doi:10.1093/aobpla/ply043.
19. Korres, N.E.; Norsworthy, J.K.; Tehranchian, P.; Gitsopoulos, T.K.; Loka, D.A.; Oosterhuis, D.M.; Gealy, D.R.; Moss, S.R.; Burgos, N.R.; Miller, M.R.; et al. Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: A review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 12, doi:10.1007/s13593-016-0350-5.
20. Hedhly, A. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *74*, 9–16, doi:10.1016/j.envexpbot.2011.03.016.
21. Potts, S.G.; Vulliamy, B.; Dafni, A.; Ne'eman, G.; Willmer, P. Linking bees and flowers: How do floral communities structure pollinator communities? *Ecology* **2003**, *84*, 2628–2642, doi:10.1890/02-0136.
22. Nicolson, S.W. Nectar consumers. In *Nectaries and Nectar*; Springer Netherlands: Heidelberg ; The Netherlands, 2007; pp. 289–342.
23. Cane, J.H. Adult pollen diet essential for egg maturation by a solitary *Osmia* bee. *J. Insect Physiol.* **2016**, *95*, 105–109, doi:10.1016/j.jinsphys.2016.09.011.
24. Hanley, M.E.; Franco, M.; Pichon, S.; Darvill, B.; Goulson, D. Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in british herbaceous plants. *Funct. Ecol.* **2008**, *22*, 592–598, doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01415.x.
25. Bailes, E.J.; Ollerton, J.; Pattrick, J.G.; Glover, B.J. How can an understanding of plant–pollinator interactions contribute to global food security? *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *26*, 72–79, doi:10.1016/j.pbi.2015.06.002.
26. Cartar, R.V. Resource tracking by bumble bees: Responses to plant-level differences in quality. *Ecology* **2004**, *85*, 2764–2771, doi:10.1890/03-0484.
27. Kudo, G.; Harder, L.D. Floral and inflorescence effects on variation in pollen removal and seed production among six legume species. *Funct. Ecol.* **2005**, *19*, 245–254, doi:10.1111/j.1365-2435.2005.00961.x.
28. Somme, L.; Vanderplanck, M.; Michez, D.; Lombaerde, I.; Moerman, R.; Wathelet, B.; Wattiez, R.; Lognay, G.; Jacquemart, A.-L. Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie* **2014**, *46*, 92–106, doi:10.1007/s13592-014-0307-0.

29. Zhao, Z.; Lu, N.; Conner, J.K. Adaptive pattern of nectar volume within inflorescences: Bumblebee foraging behavior and pollinator-mediated natural selection. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep34499.
30. Vanderplanck, M.; Moerman, R.; Rasmont, P.; Lognay, G.; Wathelet, B.; Wattiez, R.; Michez, D. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86209, doi:10.1371/journal.pone.0086209.
31. Vaudo, A.D.; Tooker, J.F.; Grozinger, C.M.; Patch, H.M. Bee nutrition and floral resource restoration. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2015**, *10*, 133–141, doi:10.1016/j.cois.2015.05.008.
32. Roger, N.; Michez, D.; Wattiez, R.; Sheridan, C.; Vanderplanck, M. Diet effects on bumblebee health. *J. Insect Physiol.* **2017**, *96*, 128–133, doi:10.1016/j.jinsphys.2016.11.002.
33. Gérard, M.; Vanderplanck, M.; Wood, T.; Michez, D. Global warming and plant–pollinator mismatches. *Emerg. Top. Life Sci.* **2020**, doi:10.1042/ETLS20190139.
34. Scaven, V.L.; Rafferty, N.E. Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Curr. Zool* **2013**, *59*, 418–426.
35. Descamps, C.; Quinet, M.; Jacquemart, A.-L. The effects of drought on plant–pollinator interactions: What to expect? *Environ. Exp. Bot.* **2021**, *182*, 104297, doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104297.
36. Vervoort, A.; Cawoy, V.; Jacquemart, A.-L. Comparative reproductive biology in co-occurring invasive and native *Impatiens* species. *Int. J. Plant Sci.* **2011**, *172*, 366–377.
37. Duan, H.; Wu, J.; Huang, G.; Zhou, S.; Liu, W.; Liao, Y.; Yang, X.; Xiao, Z.; Fan, H. Individual and interactive effects of drought and heat on leaf physiology of seedlings in an economically important crop. *AoB Plants* **2017**, *9*, doi:10.1093/aobpla/plw090.
38. Zhou, R.; Yu, X.; Ottosen, C.-O.; Rosenqvist, E.; Zhao, L.; Wang, Y.; Yu, W.; Zhao, T.; Wu, Z. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biol.* **2017**, *17*, 24, doi:10.1186/s12870-017-0974-x.

39. Amuji, C.F.; Beaumont, L.J.; Atwell, B.J. The effect of co-occurring heat and water stress on reproductive traits and yield of tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Hortic. J.* **2020**, *89*, 530–536, doi:10.2503/hortj.UTD-166.
40. Wu, C.A.; Lowry, D.B.; Nutter, L.I.; Willis, J.H. Natural variation for drought-response traits in the *Mimulus guttatus* species complex. *Oecologia* **2010**, *162*, 23–33, doi:10.1007/s00442-009-1448-0.
41. Sivakumar, R.; Srividhya, S. Impact of drought on flowering, yield and quality parameters in diverse genotypes of tomato (*Solanum Lycopersicum* L.). *Adv. Hortic. Sci.* **2016**, *30*, 3–11–11, doi:10.13128/ahs-18696.
42. Connor, D.J.; Jones, T.R. Response of sunflower to strategies of irrigation ii. morphological and physiological responses to water stress. *Field Crop. Res.* **1985**, *12*, 91–103, doi:10.1016/0378-4290(85)90056-5.
43. Bartoli, C.G.; Casalongué, C.A.; Simontacchi, M.; Marquez-Garcia, B.; Foyer, C.H. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, *94*, 73–88, doi:10.1016/j.envexpbot.2012.05.003.
44. Souza, P.I.D.; Egli, D.B.; Bruening, W.P. Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. *Agron. J.* **1997**, *89*, 807–812, doi:10.2134/agronj1997.00021962008900050015x.
45. Rivero, R.M.; Kojima, M.; Gepstein, A.; Sakakibara, H.; Mittler, R.; Gepstein, S.; Blumwald, E. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19631–19636, doi:10.1073/pnas.0709453104.
46. Fahad, S.; Bajwa, A.A.; Nazir, U.; Anjum, S.A.; Farooq, A.; Zohaib, A.; Sadia, S.; Nasim, W.; Adkins, S.; Saud, S.; et al. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fpls.2017.01147.
47. Maxwell, K.; Johnson, G.N. Chlorophyll fluorescence—A practical guide. *J. Exp. Bot.* **2000**, *51*, 659–668, doi:10.1093/jexbot/51.345.659.
48. Farooq, M.; Wahid, A.; Kobayashi, N.; Fujita, D.; Basra, S.M.A. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* **2009**, *29*, 185–212, doi:10.1051/agro:2008021.

49. Lamaoui, M.; Jemo, M.; Datla, R.; Bekkaoui, F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Front. Chem.* **2018**, *6*, doi:10.3389/fchem.2018.00026.
50. Sehgal, A.; Sita, K.; Bhandari, K.; Kumar, S.; Kumar, J.; Prasad, P.V.V.; Siddique, K.H.M.; Nayyar, H. Influence of drought and heat stress, applied independently or in combination during seed development, on qualitative and quantitative aspects of seeds of lentil (*Lens Culinaris* Medikus) genotypes, differing in drought sensitivity. *Plant Cell Environ.* **2019**, *42*, 198–211, doi:10.1111/pce.13328.
51. Lawlor, D.W.; Cornic, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* **2002**, *25*, 275–294, doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x.
52. Aubert, L.; Konrádová, D.; Barris, S.; Quinet, M. Different drought resistance mechanisms between two buckwheat species *Fagopyrum esculentum* and *Fagopyrum tataricum*. *Physiol. Plant.* **2020**, 1–10, doi:10.1111/ppl.13248.
53. Hatfield, J.L.; Prueger, J.H. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather Clim. Extrem.* **2015**, *10*, 4–10, doi:10.1016/j.wace.2015.08.001.
54. Khan, H.R.; Paull, J.G.; Siddique, K.H.M.; Stoddard, F.L. Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crop. Res.* **2010**, *115*, 279–286, doi:10.1016/j.fcr.2009.09.003.
55. Adejare, F.B.; Umebese, C.E. Stomatal resistance to low leaf water potential at different growth stages affects plant biomass in *Glycine max* L. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **2007**, *2*, 136, doi:10.3844/ajabssp.2007.136.141.
56. Ghanem, M.E.; Van Elteren, J.; Albacete, A.; Quinet, M.; Martínez-Andújar, C.; Kinet, J.-M.; Pérez-Alfocea, F.; Lutts, S. Impact of salinity on early reproductive physiology of tomato (*Solanum lycopersicum*) in relation to a heterogeneous distribution of toxic ions in flower organs. *Funct. Plant Biol.* **2009**, *36*, 125–136, doi:10.1071/FP08256.
57. Sharma, A.; Shahzad, B.; Kumar, V.; Kohli, S.K.; Sidhu, G.P.S.; Bali, A.S.; Handa, N.; Kapoor, D.; Bhardwaj, R.; Zheng, B. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules* **2019**, *9*, 285, doi:10.3390/biom9070285.

58. Alhaithloul, H.A.; Soliman, M.H.; Ameta, K.L.; El-Esawi, M.A.; Elkelish, A. Changes in ecophysiology, osmolytes, and secondary metabolites of the medicinal plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* subjected to drought and heat stress. *Biomolecules* **2020**, *10*, 43, doi:10.3390/biom10010043.
59. Sami, F.; Yusuf, M.; Faizan, M.; Faraz, A.; Hayat, S. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *109*, 54–61, doi:10.1016/j.plaphy.2016.09.005.
60. Al-Ghzawi, A.A.-M.; Zaitoun, S.; Gosheh, H.; Alqudah, A. Impacts of drought on pollination of *Trigonella Moabitica* (Fabaceae) via bee visitations. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2009**, *55*, 683–692, doi:10.1080/03650340902821666.
61. Phillips, B.B.; Shaw, R.F.; Holland, M.J.; Fry, E.L.; Bardgett, R.D.; Bullock, J.M.; Osborne, J.L. Drought reduces floral resources for pollinators. *Glob. Chang. Biol.* **2018**, *24*, 3226–3235, doi:10.1111/gcb.14130.
62. Liu, Y.; Mu, J.; Niklas, K.J.; Li, G.; Sun, S. Global warming reduces plant reproductive output for temperate multi-inflorescence species on the Tibetan plateau. *New Phytol.* **2012**, *195*, 427–436, doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04178.x.
63. Takkis, K.; Tscheulin, T.; Petanidou, T. Differential effects of climate warming on the nectar secretion of early- and late-flowering mediterranean plants. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fpls.2018.00874.
64. Descamps, C.; Marée, S.; Hugon, S.; Quinet, M.; Jacquemart, A.-L. Species-specific responses to combined water stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (*Echium*, Boraginaceae). *Ecol. Evol.* **2020**, doi:10.1002/ece3.6389.
65. Galen, C. Why do flowers vary? the functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioScience* **1999**, *49*, 631–640, doi:10.2307/1313439.
66. Halpern, S.L.; Adler, L.S.; Wink, M. Leaf herbivory and drought stress affect floral attractive and defensive traits in *Nicotiana quadrivalvis*. *Oecologia* **2010**, *163*, 961–971, doi:10.1007/s00442-010-1651-z.
67. Ji, X.; Shiran, B.; Wan, J.; Lewis, D.C.; Jenkins, C.L.D.; Condon, A.G.; Richards, R.A.; Dolferus, R. Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant Cell Environ.* **2010**, *33*, 926–942, doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02130.x.

68. Ruan, Y.-L.; Patrick, J.; Bouzayen, M.; Osorio, S.; Fernie, A.R. Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 656–665, doi:10.1016/j.tplants.2012.06.005.
69. Khan, H.A.; Siddique, K.H.M.; Colmer, T.D. Vegetative and reproductive growth of salt-stressed chickpea are carbon-limited: Sucrose infusion at the reproductive stage improves salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 2001–2011, doi:10.1093/jxb/erw177.
70. Liu, Y.-H.; Offler, C.E.; Ruan, Y.-L. Regulation of fruit and seed response to heat and drought by sugars as nutrients and signals. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, doi:10.3389/fpls.2013.00282.
71. Gómez, J.M.; Perfectti, F.; Armas, C.; Narbona, E.; González-Megías, A.; Navarro, L.; DeSoto, L.; Torices, R. Within-Individual phenotypic plasticity in flowers fosters pollination niche shift. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4019, doi:10.1038/s41467-020-17875-1.
72. Miller-Struttmann, N.E.; Geib, J.C.; Franklin, J.D.; Kevan, P.G.; Holdo, R.M.; Ebert-May, D.; Lynn, A.M.; Kettenbach, J.A.; Hedrick, E.; Galen, C. Functional mismatch in a bumble bee pollination mutualism under climate change. *Science* **2015**, *349*, 1541–1544, doi:10.1126/science.aab0868.
73. Schiestl, F.P.; Johnson, S.D. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends Ecol. Evol.* **2013**, *28*, 307–315, doi:10.1016/j.tree.2013.01.019.
74. Fowler, R.E.; Rotheray, E.L.; Goulson, D. Floral abundance and resource quality influence pollinator choice. *Insect Conserv. Divers.* **2016**, *9*, 481–494, doi:10.1111/icad.12197.
75. Takkis, K.; Tscheulin, T.; Tsalkatis, P.; Petanidou, T. Climate change reduces nectar secretion in two common mediterranean plants. *AoB Plants* **2015**, *7*, plv111.
76. Gallagher, M.K.; Campbell, D.R. Shifts in water availability mediate plant–pollinator interactions. *New Phytol.* **2017**, *215*, 792–802, doi:10.1111/nph.14602.
77. Villarreal, A.G.; Freeman, C.E. Effects of temperature and water stress on some floral nectar characteristics in *Ipomopsis longiflora* (Polemoniaceae) under controlled conditions. *Bot. Gaz.* **1990**, *151*, 5–9.
78. Mu, J.; Peng, Y.; Xi, X.; Wu, X.; Li, G.; Niklas, K.J.; Sun, S. Artificial asymmetric warming reduces nectar yield in a Tibetan alpine species of Asteraceae. *Ann. Bot.* **2015**, *116*, 899–906, doi:10.1093/aob/mcv042.

79. Waser, N.M.; Price, M.V. Drought, pollen and nectar availability, and pollination success. *Ecology* **2016**, *97*, 1400–1409, doi:10.1890/15-1423.1.
80. Cawoy, V.; Jonard, M.; Mayer, C.; Jacquemart, A.-L. Do abundance and proximity of the alien *Impatiens glandulifera* affect pollination and reproductive success of two sympatric co-flowering native species? *J. Pollinat. Ecol.* **2012**, *10*, 130–139.
81. Goldberg, R.B.; Beals, T.P.; Sanders, P.M. Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1217–1229.
82. Borghi, M.; Perez de Souza, L.; Yoshida, T.; Fernie, A.R. Flowers and climate change: A metabolic perspective. *New Phytol.* **2019**, *224*, 1425–1441, doi:10.1111/nph.16031.
83. Gray, S.B.; Brady, S.M. Plant developmental responses to climate change. *Dev. Biol.* **2016**, *419*, 64–77, doi:10.1016/j.ydbio.2016.07.023.
84. Sage, T.L.; Bagha, S.; Lundsgaard-Nielsen, V.; Branch, H.A.; Sultmanis, S.; Sage, R.F. The Effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crop. Res.* **2015**, *182*, 30–42, doi:10.1016/j.fcr.2015.06.011.
85. Russo, L.; Keller, J.; Vaudo, A.D.; Grozinger, C.M.; Shea, K. Warming increases pollen lipid concentration in an invasive thistle, with minor effects on the associated floral-visitor community. *Insects* **2020**, *11*, 20, doi:10.3390/insects11010020.
86. Muth, F.; Francis, J.S.; Leonard, A.S. Bees use the taste of pollen to determine which flowers to visit. *Biol. Lett.* **2016**, *12*, 20160356, doi:10.1098/rsbl.2016.0356.
87. Yu, J.; Jiang, M.; Guo, C. Crop pollen development under drought: From the phenotype to the mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20071550.
88. Pressman, E.; Peet, M.M.; Pharr, D.M. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann. Bot.* **2002**, *90*, 631–636, doi:10.1093/aob/mcf240.
89. Sato, S.; Kamiyama, M.; Iwata, T.; Makita, N.; Furukawa, H.; Ikeda, H. Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male

reproductive development. *Ann. Bot.* **2006**, *97*, 731–738, doi:10.1093/aob/mcl037.

90. Cook, S.M.; Awmack, C.S.; Murray, D.A.; Williams, I.H. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecol. Entomol.* **2003**, *28*, 622–627, doi:10.1046/j.1365-2311.2003.00548.x.
91. Bieberich, J.; Müller, S.; Feldhaar, H.; Lauerer, M. Invasive *Impatiens glandulifera*: A driver of changes in native vegetation? *Ecol. Evol.* **2021**, *11*, 1320–1333, doi:10.1002/ece3.7135.
92. Beerling, D.J.; Perrins, J.M. *Impatiens glandulifera* Royle (*Impatiens Roylei* Walp.). *J. Ecol.* **1993**, *81*, 367–382.
93. Abramoff, M.D.; Magalhães, P.J.; Ram, S.J. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **2004**, *11*, 36–42.
94. Yemm, E.W.; Willis, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* **1954**, *57*, 508.
95. Alexander, M.P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* **1969**, *44*, 117–122, doi:10.3109/10520296909063335.
96. Vanderplanck, M.; Leroy, B.; Wathelet, B.; Wattiez, R.; Michez, D. Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidologie* **2014**, *45*, 192–204, doi:10.1007/s13592-013-0239-0.
97. Team, R.C. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing ; 2020.

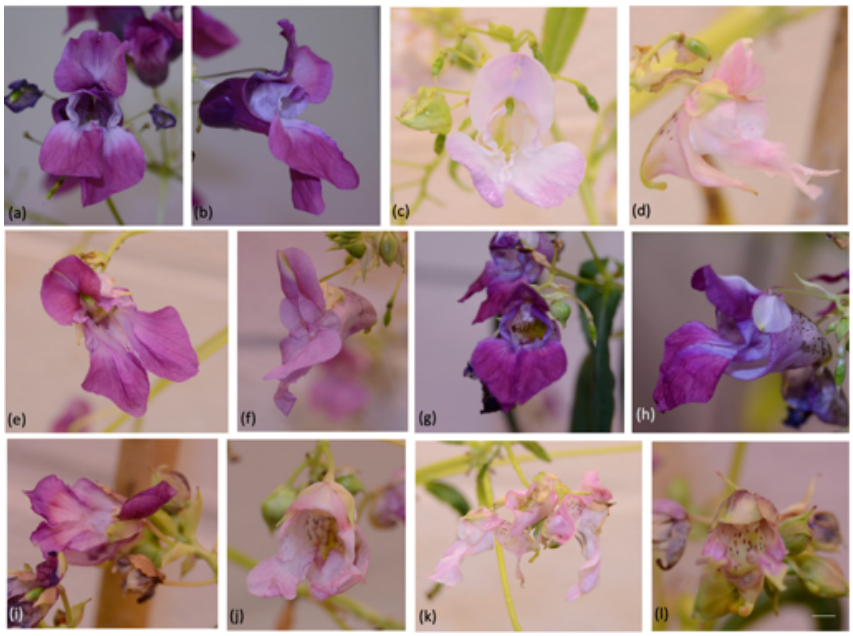


Figure II.17 : Fleurs d'*I. glandulifera* observée dans les différents traitements (a-b) 21WW, (c-d) 21WS, (e-f) 24WW, (g-h) 24WS, (i-j) 27WW, (k-l) 27WS. 21=21°C ; 24=24°C ; 27=27°C; WW = well-watered (arrosage régulier) ; WS = water-stressed (arrosage réduit, humidité du sol < 30%). Barre d'échelle = 1 cm.

Partie III : Impacts de la hausse de température et du stress hydrique sur la quantité et composition de ressources florales et les répercussions sur le comportement de visites des pollinisateurs

Cette partie III consiste en un approfondissement de la seconde question de recherche concernant l'impact des stress sur les ressources florales (chapitre 5) et de la troisième question de recherche concernant l'effets des modifications de traits floraux et ressources florales sur le comportement des pollinisateurs (chapitre 6).

Pour ces deux chapitres, nous avons travaillé sur la même espèce *B. officinalis*.

Chapter 5 : Climate change–induced stress reduces quantity and alters composition of nectar and pollen from a bee-pollinated species (*Borago officinalis*, Boraginaceae)

Dans le chapitre 5, nous approfondissons les analyses au niveau des ressources florales produites sous stress par *B. officinalis*. Concernant le nectar, nous avons remesuré précisément les modifications de volume et de teneur en sucres. Nous avons également analysé les modifications de composition en sucres et en acides aminés. Concernant le pollen, nous avons estimé la quantité produite par fleur et quantifié la teneur en polypeptides et la composition en acides aminés. Ces analyses nous ont permis de répondre à la seconde question de recherche concernant l'impact des stress sur la composition des ressources florales (Fig. III.1). Cette expérience a été réalisée en 2020 avec l'aide de C. Buyens pour l'analyse des teneurs en polypeptides et de H. Dailly pour les analyses de composition en sucres et d'acides aminés. Notre hypothèse était que la combinaison d'une hausse de température et d'un stress hydrique affecterait les quantités de ressources florales et modifierait leur composition.

Les apports de ce chapitre par rapport à la seconde questions de recherche sont synthétisés ci-dessous.



Figure III.1 : Schéma conceptuel de l'organisation des chapitres 2 à 6 de la thèse en fonction des thèmes explorés et des espèces modèles. L'encadré bleu correspond au chapitre d'intérêt

Le chapitre 5 confirme certains résultats obtenus dans le chapitre 2 et nous amène de nouvelles perspectives concernant l'impact des stress thermique et hydrique sur la composition des ressources florales.

Les résultats concernant les modifications de quantité de nectar (volume et teneur en sucres) obtenus précédemment chez *B. officinalis* sont confirmés et nous avons observé que les compositions en sucres et en acides aminés du nectar sont aussi impactés par les stress. Nous avons observé que le stress hydrique a eu comme conséquence de diminuer de 4-5% la proportion de sucrose et d'augmenter les proportions de glucose et fructose de 2-3%, ce qui s'est répercuté sur le ratio sucrose/hexose qui a diminué. La quantité totale en acides aminés dans le nectar était en moyenne d'environ 2 µg par fleur, et la concentration a augmenté avec la hausse de température et le stress hydrique. Cinq acides aminés ont augmenté en concentration avec la hausse des températures et/ou le stress hydrique : l'alanine, l'arginine, la phenylalanine, la proline et la valine. Les concentrations des autres acides aminés n'ont pas été influencées. Le pourcentage d'acides aminés essentiels était supérieur à 21WW (environ 40%), comparativement aux autres traitements (en dessous de 30%).

Les résultats concernant la teneur en polypeptides du pollen ont été plutôt inattendus. Alors qu'au chapitre 4, nous avions montré une diminution de 65% de la teneur en polypeptides dans le pollen suite à la combinaison des stress chez *I. glandulifera*, ici, nous observons la tendance inverse chez *B. officinalis* avec une augmentation de 200% entre 21WW et 27WS. Cependant, le poids de pollen par fleur diminue de moitié entre 21°C et 27°C. La quantité totale en acides aminés dans le polle était en moyenne d'environ 0.22 mg par fleur ; mais à la différence du nectar, la concentration totale n'a pas été affectée par la combinaison de stress, ni la proportion d'acides aminés essentiels. Cependant, la proportion de certains acides aminés a varié de manière significative avec l'influence des stress : 7 acides aminés ont diminué avec l'augmentation de température (asparagine, glycine, serine, alanine, isoleucine, valine, leucine) et 3 ont augmenté avec le stress hydrique (phenylalanine, proline, hydroxyproline).

Globalement, les modifications de quantité et de composition sont moindres pour le pollen par rapport au nectar en réponse aux stress hydrique et thermique.

Climate change–induced stress reduces quantity and alters composition of nectar and pollen from a bee-pollinated species (*Borago officinalis*, Boraginaceae)

Charlotte Descamps, Muriel Quinet, Anne-Laure Jacquemart

Earth and Life Institute– Agronomy, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Correspondence : Charlotte Descamps, email: charlotte.descamps@uclouvain.be

Submitted in Frontiers in Plant Science (July 2021)

Abstract

In temperate ecosystems, elevated temperatures and drought occur especially during spring and summer, which are crucial periods for flowering, pollination and reproduction of a majority of temperate plants. While many mechanisms may underlie pollinator decline in the wake of climate change, the interactive effects of temperature and water stress on the quantity and quality of floral nectar and pollen resources remain poorly studied. We investigated the impact of temperature rise (+3°C and +6°C) and water stress (soil humidity lower than 15%) on the floral resources produced by the bee-pollinated species *Borago officinalis*. Nectar volume decreased with both temperature rise and water stress, resulting in a 60% decrease in the total quantity of nectar sugars (mg) produced per flower. Temperature rise but not water stress also induced a 50% decrease in pollen weight per flower but a 65% increase in pollen polypeptide concentration. Both temperature rise and water stress increased the total amino acid concentration and the essential amino acid percentage in nectar but not in pollen. In both pollen and nectar, the relative percentage of the different amino acids were modified under stresses. We discuss these modifications in floral resources in regards to plant–pollinator interactions and consequences on plant pollination success and on insect nutritional needs.

Keywords : water stress, temperature rise, nectar, pollen, polypeptides, amino acids, sugars, floral rewards

1. Introduction

Drought combined with heatwaves are expected to increase in both frequency and intensity under climate change (IPCC, 2018; Spinoni et al., 2018). Climate-induced abiotic stresses can trigger physiological and morphological changes in flowering plants (Lamaoui et al., 2018; Pandey et al., 2015; Scaven & Rafferty, 2013), especially during plant reproductive phases (Barnabás et al., 2008; Scheepens et al., 2018). Plant–pollinator interactions rely on floral traits and resources (Michener, 2007), which may be disrupted by plant stress responses. Given that most angiosperms depend on insects for reproduction (IPBES, 2016; Ollerton et al., 2011), climate-driven alterations in plant–pollinator interactions could have severe ecological and economic consequences globally (Potts et al., 2010; Settele et al., 2016). The major pollinators in temperate regions are bees (Hymenoptera, Anthophila), which exclusively depend on pollen and nectar resources for their survival (Brodschneider & Crailsheim, 2010; IPBES, 2016; Michener, 2007; Nicolson, 2011; Vaudo et al., 2015).

Floral resources for pollinators include nectar and pollen. Nectar consists in a sweet aqueous solution and represents the major energy source for pollinating insects. In addition to sugars (mainly glucose, fructose and sucrose), nectar also contains amino acids, minerals and secondary metabolites in lower quantities (Nicolson and Thornburg

2007; Parachnowitsch, Manson, and Sletvold 2019). After sugars, amino acids are the most abundant nutrients in nectar (Heil, 2011). Amino acid composition and concentration differ depending on plant species and environmental conditions (Baker 1977; Venjakob, Leonhardt, and Klein 2020; Gardener and Gillman 2002).
Pollen consists mostly of proteins and lipids and is a major nutrient source for larval growth and development and for adult immunocompetence, reproduction and longevity (Moerman et al., 2017; Moquet et al., 2017; Pasquale et al., 2016; Roulston & Cane, 2000). As bees cannot synthesize essential amino acids *de novo*, they rely exclusively on pollen for these essential compounds (de Groot, 1952; Nicolson, 2011). Protein content is highly variable among plant species, ranging from 2.5% to 60% of dry mass (Roulston and Cane 2000; Vanderplanck, Moerman et al. 2014). Protein content alone does not define the nutritional value of pollen for bees, as it also depends on the amino acid composition.

The combined effects of water stress and temperature rise on pollen and nectar resources remain poorly studied (Forrest 2016; Scaven and Rafferty 2013; Borghi et al. 2019). These abiotic constraints can individually alter both the composition and quantity of floral resources, but responses are often species- and context-dependent (Descamps, Quinet, et al., 2021; Scaven & Rafferty, 2013). Nectar is a floral resource with a dynamic secretion, varying in volume and composition with environmental conditions, flower age and position (Corbet, 2003; Nicolson & Thornburg, 2007; Parachnowitsch et al., 2019). Nectar volume decreases with water stress and supra-optimal temperatures in many species (Scaven and Rafferty 2013; Descamps, Quinet, and Jacquemart 2021). Supra-optimal temperatures are temperature above the temperature optimum for plant growth and reproduction, which is species-specific (Korres et al., 2016). The effects of abiotic stresses on the sugar concentrations in nectar are less clear: it increases or remains stable depending on the species and abiotic conditions (Phillips et al. 2018; Brunet and Van Etten 2019; Takkis, Tscheulin, and Petanidou 2018; Descamps et al. 2020).

Pollen is particularly sensitive to abiotic stresses and all stages of pollen development are affected, leading to a reduced production of pollen grains and a lower pollen viability under stressful conditions (Koti et al., 2005; Mesihovic et al., 2016; Pacini & Dolferus, 2019). Temperature rise and water stress which can impair photosynthesis process, may negatively affect sucrose metabolism and transport (Prasad et al., 2008; Sehgal et al., 2019). The photosynthesis changes reduce starch and lipid accumulation in pollen grains, leading to a decrease of pollen viability (Borghi et al., 2019; Pressman et al., 2002). Modifications of pollen composition can negatively impact the nutritive value for pollinators, potentially reducing their foraging performance, health and survival (Roger et al., 2017; Vanderplanck, Moerman, et al., 2014). Anther dehiscence at anthesis can also be impaired by stresses, limiting pollen dispersal and transfer (Smith & Zhao, 2016). All of these changes can decrease plant pollination and consequently, the plant reproductive success through fruit and seed sets (Sehgal et al., 2019; Snider & Oosterhuis, 2011; Su et al., 2013).

In this study, we quantified floral nectar and pollen modifications due to temperature rise (+3°C and +6°C) and water stress in a highly attractive bee-pollinated species, *Borago officinalis* (Boraginaceae). The reproductive development of *Borago officinalis* is impaired by temperature rise and water stress (Descamps et al., 2018), and here we study potential impacts of these stresses on traits linked to pollinator attractiveness and nutritional requirements. To our knowledge, this is the first study of its kind that examines the interaction of temperature and water stress on both the quantity and composition of floral resources.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Borago officinalis (Boraginaceae) is an annual, entomophilous bee-pollinated plant species. The flowering period extends from June to September, and about 100 flowers are produced per plant; this species is highly attractive to pollinators (Descamps et al., 2018; Thom et al., 2016).

Borago officinalis seeds were provided by Semailles nursery (Faulx-les-Tombes, Belgium). Seedlings at the three-leaf stage were transplanted into 2-L pots filled with a 1:1 (v/v) mix of sand (size 0/5, M PRO, Netherlands) and universal peat compost (DCM, Amsterdam, Netherlands) and grown in the glasshouses at the University campus (SEFY platform, Louvain-la-Neuve, Belgium). Plants were watered daily with rainwater. Treatments were applied at floral transition, 4 weeks after sowing. At this stage, bolting occurred, flowering stems developed, and the first floral buds were visible. Plants were subjected to three temperature regimes (21°C, 24°C, and 27°C) and two watering regimes (well-watered vs. water-stressed). The well-watered plants received daily watering (soil humidity about 30%), whereas the water-stressed plants were watered twice a week (soil humidity lower than 15%). Soil water content was quantified with a ProCheck sensor handheld reader (Decagon Devices, Pullman, USA). In total, six treatments were applied to 12 plants per treatment: 21°C well-watered (21WW), 21°C water- stressed (21WS), 24°C well-watered (24WW), 24°C water-stressed (24WS), 27°C well-watered (27WW), and 27°C water-stressed (27WS). Seventy-two plants were monitored in three growth chambers under three temperature regimes (day/night): 21°C/19°C, 24°C/22°C, and 27°C/25°C. The photoperiod was 16 h light:8 h dark, and relative humidity was maintained at 80% ± 10%. Each growth chamber was divided into two parts to accommodate two watering regimes. 21WW was considered the "control" treatment with optimal temperature growth and watering regime, while 27WS was considered the most stressful treatment, with combined high temperature and water stress conditions (Descamps et al., 2018). Growth chamber experiments lasted 5 weeks. Water stress was applied after 1 week of acclimation to the growth chambers (this week was considered week 0).

2.2. Nectar sampling and chemical analyses

During weeks 2 and 3, nectar was collected with 10-µl glass capillary tubes (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany). The nectar volume per flower was estimated for seven flowers per treatment by measuring the length of the nectar column in the capillary tube. The total sugar concentration (C, °Brix, g sucrose/100 g solution) was measured on the same flowers with a low-volume hand refractometer (Eclipse handheld refractometer; Bellingham and Stanley, Tunbridge Wells, UK). Nectar sugar content per flower (s, mg) was calculated as $s = 10 \times d \times v \times C$, where d is the density of a sucrose solution at concentration C ($d = 0.0037921 \times C + 0.000\,0178 \times C2 + 0.9988603$) and v is nectar volume (ml) (Prys-Jones & Corbet 1991).

Ten samples of 10 µl were taken per treatment (from a minimum of two flowers from two different plants) and analyzed for sugar composition and amino acid content. The sugar composition of the nectar was determined using gas chromatography–flame ionization detection (GC-FID, Thermo Scientific, Germany) using a Restek RTX5-MS column (30 × 0.25 mm i.d. 0.25 µm) as described by Somme et al. (2016). The nectar extracted from the capillaries was weighed (Sartorius-Basic scale 0.1 mg, Germany) and 1 ml water was added. Internal standard (50 µl of a 1000 ppm aqueous mannitol solution) was added to 50 µl diluted sample. This mixture was then dried under N_2 before forming trimethylsilyl (TMS) derivatives (using hydroxylamine hydrochloride and hexamethyldisilazide (HMDS) in pyridine). A 1-µl volume of TMS derivatives was injected into GC-FID and separated via a Restek RTX5-MS column (30 × 0.25mm i.d. 0.25 µm) in split mode (1/10). Nitrogen at 2 ml/min was used as carrier gas. The injector and detector were set to 270°C and 300°C respectively. The temperature program started at 105°C for 4 min, before increasing at a rate of 15°C/min to 280°C. This temperature was maintained for 20 min. All analytical measures were performed in duplicate.

Amino acids were quantified using high performance liquid chromatography (HPLC), in duplicate after derivatization using phthaldialdehyde (OPA) reagent in combination with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC, Meussen et al. 2014; Aubert et al. 2021). The nectar extracted from the capillaries was weighed (Sartorius-Basic scale, Germany) and 100 µl of an aqueous solution of 25 µM norvaline (used as an internal standard) was added. As no acid hydrolysis took place, we could not measure the tryptophan content. The determination of cysteine and methionine required a prior oxidation step (H_2O_2/formic acid, 110°C for 18 h). A double derivatization process was performed in pre-columns using (i) 2-mercaptoethanol 4% + 25 mg OPA dissolved in 0.5 ml methanol in a total volume of 5 ml borate buffer pH 10.4 (for detection of all amino acids except proline (PRO) and hydroxy-proline (OH-PRO)) and (ii) FMOC 0.25% in acetonitrile (for detection of cyclic amino acids: PRO and OH-PRO). Hydroxy-proline is an amino acid derived from proline by hydroxylation. Samples were injected on a Zorbax Eclipse Plus column (Agilent; 3.5 µm particle size; 150 × 21 mm) maintained at 40°C. The mobile phase was composed of (A) phosphate buffer 40 mM pH 8.4 and (B) acetonitrile/methanol/water (45:45:10 *v*/*v*/*v*) at a flow rate of 0.42 ml min^{-1} (100% A–

0% B 0.5 min; progressive increase from 0% to 57% B 0.5–25 min). OPA-derivatized and FMOC-derivatized amino acids were, respectively, detected at 340 nm and 266 nm excitation and 450 nm and 338 nm emission wavelengths.

2.3. Pollen sampling and chemical analyses

During weeks 2 and 3, pollen was collected from at least 10 flowers per treatment (minimum of two different plants). We estimated pollen production (mg) per flower by dividing the weight of each sample by the number of flowers from which pollen was collected.

Polypeptide content (molecular weight >10 kDa) of pollen was determined from 5 mg dry pollen in triplicate for each treatment following the method described in Vanderplanck et al. (2014). Total polypeptides were quantified using the bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific), with BSA as standard.
Amino acid profile and concentrations were determined from 2 mg pollen in triplicate after acid hydrolysis (with or without prior oxidation) and derivatization using OPA reagent in combination with FMOC (Aubert et al., 2021; Meussen et al., 2014). For acid hydrolysis, samples were exposed to 150 µl 6 M hydrochloric acid containing 1% (w/v) of phenol and incubated for 18 h at 110°C. For acid hydrolysis with prior oxidation, 50 µl performic acid reagent was added to the samples. The reagent consisted of 10 mg phenol crystal in 10 ml water with 1 ml 33% H_2O_2 and 9 ml 88% formic acid. After addition of the reagent, tubes were incubated for 3 h at 4°C, and 8 mg metabisulfite was then added to decompose the performic acid. Tubes were then stirred for 1.5 seconds to liberate any SO_2 produced. Derivatization and quantification were as described for the nectar samples. The essential amino acids were determined by De Groot (1952) for *Apis mellifera* and include : arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan and valine. This information is not known for wild bee species (Kriesell et al., 2017; Nikkeshi et al., 2021; Woodard & Jha, 2017).

All chemical analyses were performed in the MOCA platform and PEPA lab (UCLouvain, Louvain-la-Neuve, Belgium).

2.4. Statistical analyses

Normality of the data was visually assessed using quantile-quantile plots. Linear mixed models and analysis of variance (type II) were performed using a significance level of $p < 0.05$ to evaluate the effects of temperature, water stress and their interaction. For nectar volume, sugar concentration and pollen dry weight, analyses of variance (type II) were performed. Linear mixed models were fit including the two fixed factors, their interaction (temperature × water) and a random effect for sampling number due to repeated measurements on the same sample (sugar proportion, polypeptide concentration, amino acid concentration). Results for all amino acids were presented as relative differences compared with the control treatment (21WW) for each amino acid. The relative

difference was obtained by subtracting the value of the 21WW treatment concentration from the value of each treatment concentration, divided by the value of the 21WW treatment concentration. Amino acids are only shown when their concentrations significantly varied with temperature and/or water stress. Concentrations for each amino acid for each treatment with statistical results are available in supplementary material. To obtain a global view of the influence of temperature rise and water stress on all measures, a principal component analysis (PCA) was performed. All analyses were performed with R 3.6.1 (R Core Team, 2020), using the package *car* for *F* tests, the package *lme4* for linear mixed models, the package *Factomine*R for PCA and packages *ggplot2* and *yarr* for plots. Data are presented as mean ± standard error (SE).

3. Results

3.1. Floral resources were affected by temperature and water stress

The PCA for nectar and pollen measurements according to the different treatments explained 89.6% of the variance, with axis 1 accounting for 74.8% of the variance (Figure 1). The difference between the control treatment (21WW) and the most stressful treatment (27WS) was evident along axis 1. Floral resource quantities (nectar volume, pollen dry weight) were higher for plants grown at 21WW than for plants grown at 27WS, while pollen polypeptide concentration and nectar amino acid concentration were higher for plants grown at 27WS than for plants grown at 21WW. Axis 2 discriminated plants grown at 21WS and 24WS from plants grown at 24WW according to the amino acid concentration of pollen.

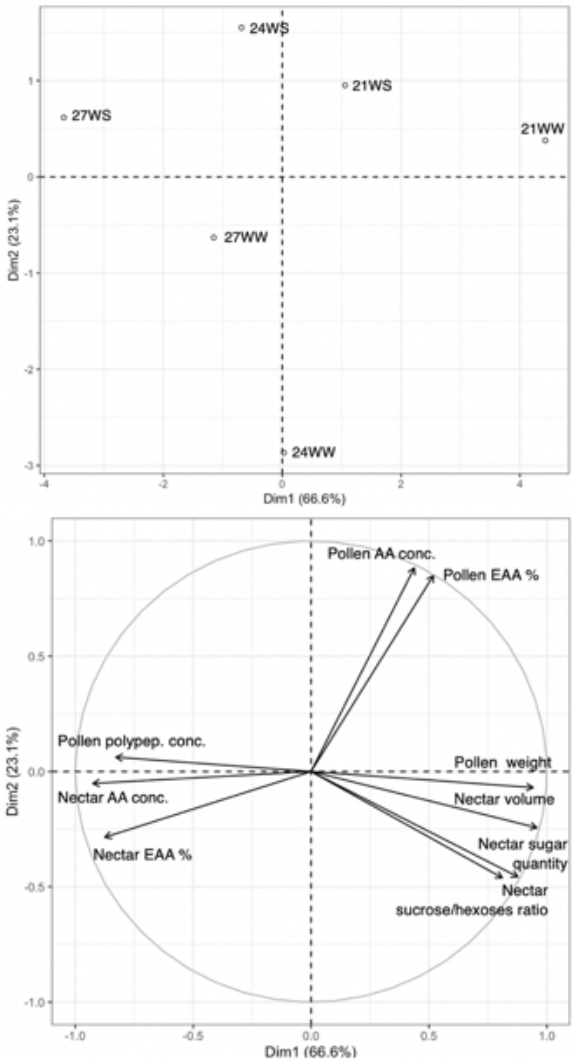


Figure 1 Principal component analysis (PCA) of nectar and pollen resource measurements from *Borago officinalis* plants grown under different temperature regimes (21°C, 24°C, 27°C) and watering regimes (WS, water-stressed; WW, well-watered): (a) treatment centroids; (b) variable loadings of PCA 3 weeks after stress induction. Polypep., polypeptides; Conc., concentration; %, percentage ; EAA, essential amino acids.

3.2. The influence of temperature and water stress on nectar

3.2.1. Nectar volume

Nectar volume decreased with higher temperatures ($F_{2,36}$ = 37.05, P < 0.001) and water stress ($F_{1,36}$ = 46.46, P < 0.001; Fig. 2a). Nectar sugar concentration increased with

temperature and was slightly higher for plants grown at 24°C and at 27°C compared to plants grown at 21°C ($F_{2,36}$ = 9.92 , P < 0.001). Nectar sugar concentration was not affected by water stress ($F_{1,36}$ = 0.06; P = 0.80; Fig. 2b). Nectar sugar quantity per flower was reduced by temperature ($F_{2,36}$ = 29.14, P < 0.001) and water stress ($F_{1,36}$ = 56.36, P < 0.001; Fig. 2c), resulting in a six-fold reduction in nectar sugar quantity for plants grown at 27WS compared to plants grown at 21WW.

Nectar volume decreased with temperature rise ($F_{2,36}$ = 37.05, P < 0.001) and water stress ($F_{1,36}$ = 46.46, P < 0.001; Fig. 2a). Nectar sugar concentration increased with temperature rise ($F_{2,36}$ = 9.92 , P < 0.001). Nectar sugar concentration was not affected by water stress ($F_{1,36}$ = 0.06; P = 0.80; Fig. 2b). In consequence, nectar sugar quantity per flower was reduced by temperature rise ($F_{2,36}$ = 29.14, P < 0.001) and water stress ($F_{1,36}$ = 56.36, P < 0.001; Fig. 2c), resulting in a six-fold reduction in nectar sugar quantity for plants grown at 27WS (0.57 ± 0.08 mg) compared to plants grown at 21WW (3.57 ± 0.28 mg).

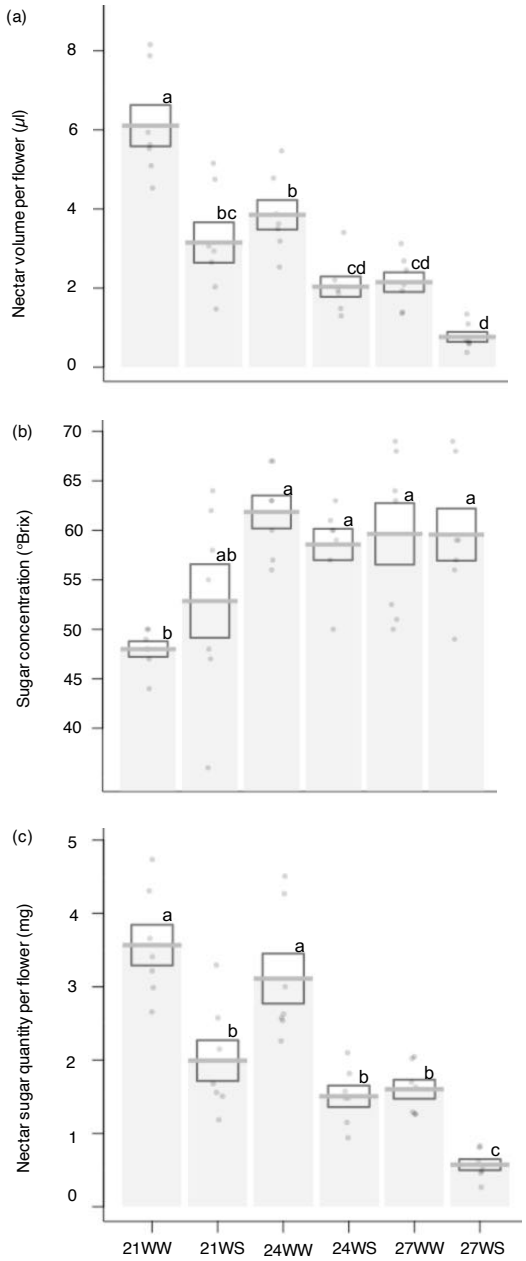


Figure 2 Effects of temperature and water stress on nectar of *Borago officinalis,* 3 weeks after stress induction: (a) nectar volume per flower (µl); (b) nectar sugar concentration (°Brix); (c) nectar sugar quantity per flower (mg). $N = 7$ plants. Data are means ± SE. Data points followed by different letters for the same parameter are significantly different at $P < 0.05$ among treatments. 21, 21°C; 24, 24°C; 27, 27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed.

3.2.2. Nectar sugar composition

Nectar composition was dominated by sucrose regardless of the treatment applied, with sucrose/hexoses ratio higher than 1 (Table 1). The proportion of fructose was higher compared to the proportion of glucose. We observed that water stress decreased the sucrose content by 4–5% and increased the glucose and fructose content by 2–3% (Table 1), resulting in a decrease of the sucrose/hexoses ratio. Temperature rise did not significantly modify any of the sugar proportions

Table 1 Effects of temperature and water stress on nectar sugar composition of *Borago officinalis* 3 weeks after stress induction.

Treatment[1]	21WW	21WS	24WW	24WS	27WW	27WS	Temp[2]	Water	Temp:Water
Fructose (%)	25.4 ± 0.6	27.6 ± 0.6	26.7 ± 0.9	28.4 ± 0.8	26.5 ± 0.9	29.8 ± 0.9	$F_{2,18}$ = 2.05; P = 0.16	$F_{1,18}$ = 12.03; P = 0.003	$F_{2,18}$ = 0.52; P = 0.6
Glucose (%)	17.2 ± 0.3	19.3 ± 0.5	17.9 ± 0.6	19.8 ± 0.9	18.3 ± 0.7	20.7 ± 0.5	$F_{2,18}$ = 1.96; P = 0.17	$F_{1,18}$ = 15.94; P < 0.001	$F_{2,18}$ = 0.08; P = 0.92
Sucrose (%)	57.3 ± 0.8	53.2 ± 1.1	55.3 ± 1.5	51.8 ± 1.7	55.2 ± 1.6	49.5 ± 1.4	$F_{2,18}$ = 2.09; P = 0.15	$F_{1,18}$ = 14.28; P = 0.001	$F_{2,18}$ = 0.3 P = 0.75
Sucrose/hexose ratio	1.35 ± 0.05	1.14 ± 0.05	1.25 ± 0.07	1.09 ± 0.07	1.24 ± 0.08	0.99 ± 0.05	$F_{2,18}$ = 1.84; P = 0.19	$F_{1,18}$ = 13.89; P = 0.002	$F_{2,18}$ = 0.23; P = 0.79

[1] N = 3 (replicates). Data are mean ± SE. 21, 21°C; 24, 24°C; 27, 27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed. [2] Two-way ANOVA results, testing for the main and the interactive effect of temperature (Temp.) and water treatments.

3.2.3. Nectar amino acid content

The total nectar amino acid content was on average 0.19 μg per flower at 21WW (control). The three most abundant amino acids in percentage in nectar of plants grown at 21WW were proline (22.7%), histidine (10.9%) and glutamine (8.8%). The total amino acid concentration increased with temperature rise ($F_{2,12}$ = 17.1, P < 0.001) and water stress ($F_{1,12}$ = 10.4, P = 0.007; Fig. 3a). Increase of total amino acid concentration was explained by the increase of five amino acid concentrations: alanine, arginine, phenylalanine, proline and valine (Fig. 3c, Table S1). Temperature induced increases in the concentrations of arginine, alanine and valine. Water stress induced increases in the concentration of phenylalanine. Both types of stress increased the concentration of proline. The three most abundant amino acids in nectar of plants grown at 27WS were proline (40.1%), serine (10.5%) and glutamine (8.6%). The concentrations of the other amino acids were not affected by the applied abiotic stresses (Table S1). The proportion of essential amino acids was higher in nectar from plants grown at 21WW compared to the other treatments (Fig. 3b, Table S1).

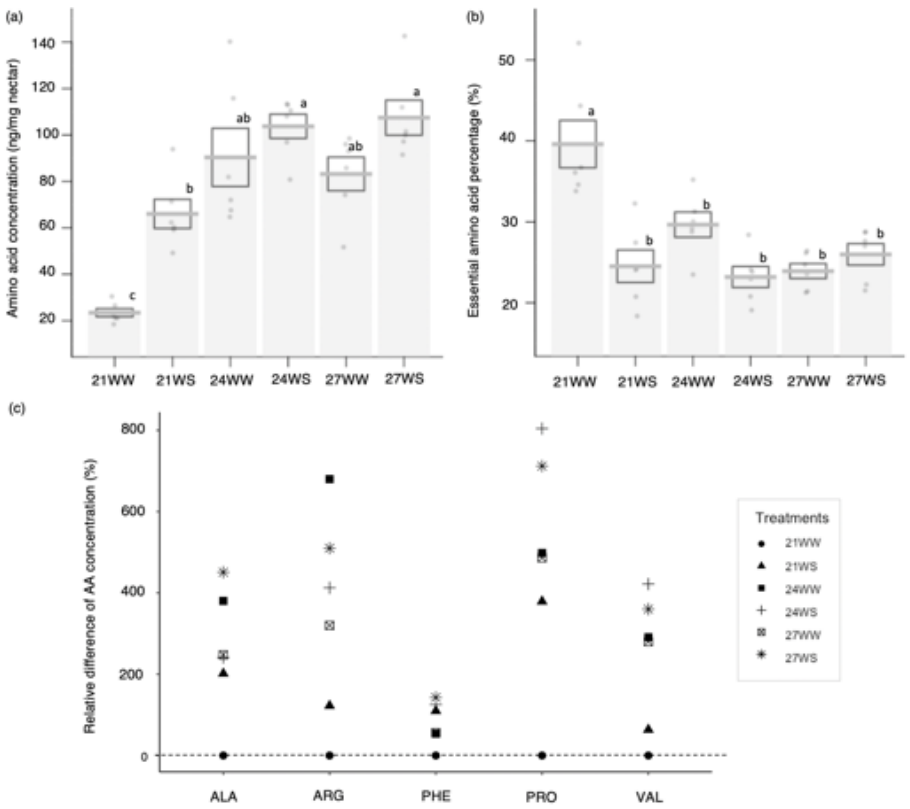


Figure 3 Effects of temperature rise and water stress on nectar amino acid content of *Borago officinalis,* 3 weeks after stress induction: (a) total nectar amino acid concentration (ng/mg nectar);

(b) essential amino acid percentage compared to total concentration (%); (c) relative difference in amino acid concentration (%). N = 3 plants (replicates). (a, b) Data are mean ± SE; data points followed by different letters for the same parameter are significantly different at $P < 0.05$ among treatments; (c) data are mean and relative values compared with 21WW. 21, 21°C; 24, 24°C; 27, 27°C; WW, well-watered; WS, water-stressed; Only significant changes in amino acid concentrations are shown : ALA, alanine; ARG, arginine; PHE, phenylalanine; VAL, valine; PRO, proline.

3.3. The influence of temperature and water stress on pollen

3.3.1. Pollen quantity

Pollen weight per flower decreased with temperature stress ($F_{2,24} = 5.95$, $P = 0.007$) but was not affected by water stress ($F_{1,24} = 1.75$, $P = 0.2$; Fig. 4a). Pollen weight was halved between plants grown at 21°C (0.61± 0.05 mg) and 27°C (0.35± 0.09 mg).

3.3.2. Pollen polypeptides

The polypeptide concentration increased by almost 200% between control conditions and the most stressful conditions (27.6 ± 4.1 μg/mg pollen at 21WW versus 77.7 ± 6.6 μg/mg pollen at 27WS). Pollen polypeptide concentration increased with temperature ($F_{2,78} = 69.29$, $P < 0.001$; Fig. 4b) but was not affected by water stress ($F_{1,78} = 3.25$, $P = 0.08$). The average quantity of polypeptides in pollen per flower remained constant among treatments (18.6 μg/flower at 21WW compared to 18.8 μg/flower at 27WS).

3.3.3. Pollen amino acid content

Under control conditions (21WW), flowers produced on average 0.23 mg of total pollen amino acids. For plants grown at 21WW, the three most abundant amino acids in pollen were lysine (16.2%), arginine (11.2%) and glycine (10.7%).

Total amino acid concentrations did not significantly differ with temperature rise ($F_{2,24} = 1.26$, $P = 0.3$; Fig. 4c) or water stress ($F_{1,24} = 1.65$, $P = 0.21$). The proportions of essential amino acids were not affected by abiotic stresses (temperature rise: $F_{2,24} = 1.47$, $P = 0.25$; water stress: $F_{1,24} = 0.83$ $P = 0.37$; Fig. 4d). However, the relative concentrations of seven amino acids (asparagine, glycine, serine, alanine, isoleucine, valine, leucine) decreased with temperature rise while the relative concentrations of three other amino acids (phenylalanine, proline, hydroxyproline) increased with water stress (Fig. 4e, Table S2). Consequently, the three most abundant amino acids in pollen for plants grown at 27WS were lysine (18.0%), proline (15.8%) and glycine (13.7%).

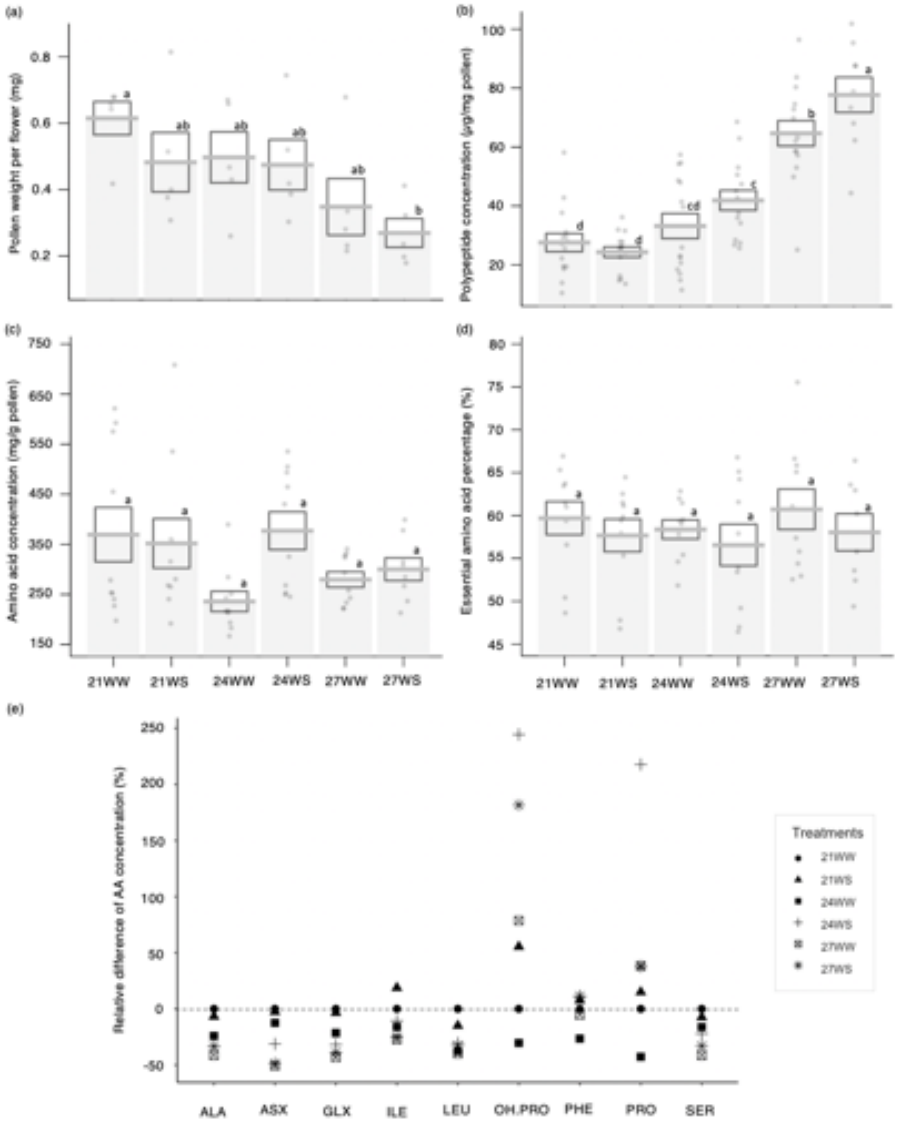


Figure 4 Effects of temperature rise and water stress on pollen quantity and composition of *Borago officinalis,* 3 weeks after stress induction: (a) pollen weight per flower (mg); (b) total polypeptide concentration (µg/mg pollen) ; (c) total nectar amino acid concentration (ng/mg nectar); (d) essential amino acid percentage compared to total concentrations (%); (e) relative difference of amino acid concentrations (%). (a,b) N = 5 plants, (c-e) N = 3 plants. (a-d) Data are mean ± SE; data points followed by different letters for the same parameter are significantly different at $P <$ 0.05 among treatments; (e) data are mean and relative values compared with 21WW. 21, 21°C; 24, 24°C; 27, 27°C; WW = well-watered; WS = water-stressed; Only significant changes in amino acid concentrations are shown : ALA, alanine; ASX, asparagine + aspartic acid; GLX, glutamine + glutamic acid; ILE, isoleucine; LEU, leucine; OH.PRO, hydroxyproline; PHE, phenylalanine; PRO, proline; SER, serine.

4. Discussion

The effects of abiotic stresses linked to climate change on floral resource quantities have been demonstrated (Descamps, Quinet, et al., 2021; Scaven & Rafferty, 2013) whereas effects on floral resource composition and nutritional quality for pollinators remain largely unknown. Our results showed that temperature rise and water stress influenced both the quantities and compositions of floral resources in the entomophilous species *Borago officinalis* even if these changes differed according to the studied parameter. While nectar volume, sugar and amino acid content were affected mostly by both stresses, pollen quantity and polypeptide concentration and amino acid content were affected almost exclusively by temperature rise. For all our studied floral resource parameters, when both temperature rise and water stress were combined, the effects of stresses were additive.

Nectar quantity and sugar composition

Temperature rise and water stress decreased the overall quantity of nectar with an 80% reduction in nectar volume. These results were consistent with previous observations that temperature rise and water stress decreased nectar volume per flower in *Borago officinalis* (Descamps et al., 2018) and in other entomophilous species (Descamps, Quinet, et al., 2021; Scaven & Rafferty, 2013). Physiologically, temperature rise and water stress reduce the quantity and availability of both water and sugars (Lamaoui et al., 2018; Lemoine et al., 2013). The amount of nectar sugars per flower was 3.5 times lower in plants grown in stressful conditions (27WS, 0.57 ± 0.08 mg) compared to control plants (21WW, 3.57 ± 0.28 mg). Decreased sugar quantity affect negatively flight performance of bees (Hendriksma et al., 2014). We also observed that sugar nectar concentration increased with temperature rise, from on average 50°Brix at 21°C to 60°Brix at 24°C and 27°C. This increase might perhaps negatively impact nectar uptake by insects as it was recently shown that the opening of the papillae of bee tongue (*Bombus terrestris*) was maximised up to a sugar concentration in the nectar of 55% concentration (Lechantre et al., 2021).

Floral resource composition, in addition to quantity, determines flower attractiveness for insect pollinators. In our study, the decrease in total sugar content was accompanied by a change in the composition of sugars in the nectar. We observed that water stress decreased the sucrose to hexoses (fructose and glucose) ratio. Relatively few studies have examined the effects of abiotic stresses on the sugar composition in nectar. Similarly to our results, Rering et al. (2020) observed that water stress decreased the proportion of sucrose compared to hexoses in the nectar of *Fagopyrum esculentum*, . However, no change in the nectar sugar composition was detected under water stress in other studies (Villarreal and Freeman 1990 on *Ipomopsis longiflora* and Clearwater et al. 2018 on *Leptospermum scoparium)* . The change in sucrose/hexoses ratio in response to water stress could be explained by a modification in the invertase activity. This enzyme, which

catalyzes the cleavage of the disaccharide sucrose into fructose and glucose, is sensitive to nectar sugar concentration (Nepi et al., 2012). According to Rering et al. (2020), nectar sucrose could also be converted into glucose and fructose due to a greater accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the nectar of water-stressed plants.

Pollen quantity and polypeptide concentration

We did not observe a decrease in pollen weight for *Borago officinalis* in response to water stress, contrarily with other studies (Borghi et al., 2019; Rering et al., 2020; Waser & Price, 2016). By contrast, we observed a 50% decrease of pollen weight due to temperature rise, between 21°C and 27°C. The sensitivity of pollen to temperature is relatively well established in the literature (Hedhly, 2011; Mesihovic et al., 2016). For example, a temperature increase of 8°C (22°C to 30°C) reduced the amount of pollen produced by about 30–50% in *Glycine max* (Koti 2005). According to the optimal foraging theory, reduced floral resource quantity per flower increases the visitation cost for pollinators, since they have to visit a greater number of flowers to obtain the same amount of resources (Latty & Trueblood, 2020; MacArthur & Pianka, 1966). The availability of floral resources is a major limiting factor for bee survival (Abrahamczyk et al., 2020; Carvell et al., 2017; Vaudo et al., 2015). Particularly, during summer periods, a shortage of floral resources is observed which could be a cause of bee species extinction (Balfour et al., 2018; Langlois et al., 2020; Requier et al., 2017; Simanonok et al., 2020; Timberlake et al., 2019). Temperature rise combined with drought can reinforce nutritional resource gaps at the landscape level.

While nectar is the main source of carbohydrates for pollinators, pollen is the main source of proteins and amino acids. We observed that temperature rise increased the concentration of polypeptides in the pollen of *B. officinalis*. The observed increase in polypeptide concentration in response to temperature rise supports the hypothesis of Van Der Kooi (2019) which posits that protein and lipid synthesis are stimulated by a temperature increase. The modification of pollen composition in response to abiotic stresses seems, however, to be species-specific. Indeed, this result contrasts with previous observations on another entomophilous species, *Impatiens glandulifera*, grown under the same controlled conditions, where we observed a decrease in pollen polypeptide concentration in response to temperature rise and water stress (Descamps, Boubnan, et al., 2021). To our knowledge, the other study investigating the impact of a temperature increase of 0.5°C compared to ambient temperature under field conditions did not detect any differences on the protein content for *Carduus nutans* (Russo 2020). Although we observed an increase in protein concentration for *Borago officinalis* pollen under temperature rise (+6°C), this increase was mitigated by a decrease in pollen weight per flower.

Amino acid composition for both nectar and pollen

Both nectar and pollen could be a source of amino acids for pollinators, although the total quantity of amino acids in pollen was more than 1000 times higher than the quantity of total amino acids in nectar per flower (at 21WW, 0.23 mg in pollen *vs* 0.19 µg in nectar). The impact of temperature rise and water stress on the amino acid profiles of flower resources differed between nectar and pollen. Total amino acid concentration increased for nectar but not for pollen, while the proportion of essential amino acids decreased in response to temperature rise for nectar but not for pollen. We observed that the total amino acid concentration in the nectar increased while the nectar volume decreased, which is consistent with the observations of Lohaus and Schwerdtfeger (2014) for several species (*Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*). Furthermore, the proportion of essential amino acids decreased in response to temperature rise in nectar but not in pollen.

We observed that the relative proportions of amino acids were modified by temperature rise and water stress for both nectar and pollen in *B.officinalis*. Amino acid profiles differ among species, although some phylogenetic trends are detected (Ruedenauer, Spaethe, et al. 2019; Weiner et al. 2010; Jeannerod et al., *submitted*). Our results show that intraspecific variations can be observed in response to abiotic stresses. We found that the concentration of proline, in particular, increased with plant stress in both pollen and nectar. Proline is an osmoprotectant that accumulates in plants in response to environmental stresses and acts as a signal to improve stress tolerance (Hayat et al., 2012). Proline is also attractive for insects (Teulier et al., 2016). It contributes to a preferred taste (Alm et al., 1990; Bertazzini et al., 2010). Proline is required for egg-laying by the queen (Hrassnigg et al., 2003) and it is also used as fuel for the initial phase flight (Carter et al., 2006; Teulier et al., 2016). No other amino acid can be metabolized as rapidly as proline and releases as much ATP without complete metabolism (Carter et al., 2006).
The concentrations of other amino acids were also impacted by plant stress, although the impact of temperature rise was more pronounced than that of water stress. Differences in amino acid composition affect flower visitor behavior, influencing olfactory learning and memory of *Apis mellifera* and bumblebees (Ruedenauer, Leonhardt, et al., 2019; Simcock et al., 2014). Recently, it was shown that bumblebee can perceive different amino acid (asparagine, cysteine, glutamic acid, hydroxyproline, lysine, phenylalanine and serine) by chemotactile information through antennae and even different concentration of a same amino acid (Ruedenauer, Leonhardt, et al., 2019). Although the nutrient requirements of honeybees and bumblebees have been partially investigated (Brodschneider & Crailsheim, 2010; Moerman et al., 2017), little is known about the nutrient requirements of wild bees (Nikkeshi et al., 2021; Woodard & Jha, 2017). For pollen, a decrease in the concentration of isoleucine and leucine, two essential amino acids, was observed at elevated temperatures. Bees prefer pollen with high concentration of essential amino acids, particularly isoleucine, leucine and valine (Cook et al., 2003). We also observed an increase in the phenylalanine proportion (+10% in nectar, + 150% in pollen) in response to water stress. Phenylalanine is induced in metabolic pathways of

response to water stress (Wan et al., 2021). It was shown that this amino acid was predominant in the nectars of 73 Mediterranean plants (Petanidou et al., 2006), contrary to another study on 30 British species, where this amino acid was present in much lower quantities (Gardener & Gillman, 2001). The predominance of phenylalanine-rich nectar is explained by Petanidou et al. (2006) as a consequence of selection by long-tongue bees due to strong phagostimulatory effect of this amino acid (Hendriksma et al., 2014; Inouye & Waller, 1984). According to our observations, this presence of phenylalanine could also be a consequence of water stress, that plants may experience under a Mediterranean climate. Not all amino acids have the same importance for insects, and there may be species-specific differences in preference. However, there is a lack of information about the specific contribution of each amino acid to insect nutritional requirements.

Our results showed that temperature rise and water stress affect both the quantity and composition of floral resources in a bee-pollinated species. We observed a decrease in the quantity of nectar and pollen and a change in their composition. The reduction of resources at the flower level may require greater foraging efforts by pollinators for their food supply. Moreover, a modification of the floral resource composition may affect the nutrition and foraging behavior of pollinators. However, the effects on resource composition need to be further investigated and tested on more plant species before conclusions can be clearly drawn.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

ALJ initiated the study and obtained funding. CD performed the experiments, analysed the results and wrote the first version of the manuscript. All authors discussed the results and contributed to the writing.

Funding

The work was supported by the UCLouvain under FSR Grant (2016-2020) (Belgium), Fonds national de la recherche scientifique FNRS, Belgium under Grant (FRFC n° 2.4613), and by the GDR Pollinéco, France under Grant (n°2058).

Acknowledgments

We thank C. Buyens (PEPA lab) and H. Dailly (MOCA platform) for technical assistance. We also thank N. Hautekeete, and D. Michez for their comments on the manuscript. This work is a part of a Ph.D. (C. Descamps). This work was published with funding from "Fondation universitaire de Belgique".

5. Reference

Abrahamczyk, S., Wohlgemuth, T., Nobis, M., Nyffeler, R., & Kessler, M. (2020). Shifts in food plant abundance for flower-visiting insects between 1900 and 2017 in the canton of Zurich, Switzerland. *Ecological Applications*, *30*(6), e02138. https://doi.org/10.1002/eap.2138

Alm, J., Ohnmeiss, T. E., Lanza, J., & Vriesenga, L. (1990). Preference of cabbage white butterflies and honey bees for nectar that contains amino acids. *Oecologia*, *84*(1), 53–57. https://doi.org/10.1007/BF00665594

Aubert, L., Decamps, C., Jacquemin, G., & Quinet, M. (2021). Comparison of Plant Morphology, Yield and Nutritional Quality of Fagopyrum esculentum and Fagopyrum tataricum Grown under Field Conditions in Belgium. *Plants*, *10*(2), 258. https://doi.org/10.3390/plants10020258

Baker, H. G. (1977). Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie*, *8*(4), 349–356.

Balfour, N. J., Ollerton, J., Castellanos, M. C., & Ratnieks, F. L. W. (2018). British phenological records indicate high diversity and extinction rates among late-summer-flying pollinators. *Biological Conservation*, *222*, 278–283. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.04.028

Barnabás, B., Jäger, K., & Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment*, *31*(1), 11–38. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x

Bertazzini, M., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Maistrello, L., & Forlani, G. (2010). Amino acid content and nectar choice by forager honeybees (Apis mellifera L.). *Amino Acids*, *39*(1), 315–318. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0474-x

Borghi, M., Perez de Souza, L., Yoshida, T., & Fernie, A. R. (2019). Flowers and climate change: A metabolic perspective. *New Phytologist*, *224*, 1425–1441. https://doi.org/10.1111/nph.16031

Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, *41*(3), 278–294. https://doi.org/10.1051/apido/2010012

Brunet, J., & Van Etten, M. L. (2019). The Response of Floral Traits Associated with Pollinator Attraction to Environmental Changes Expected under Anthropogenic Climate Change in High-Altitude Habitats. *International Journal of Plant Sciences*, *180*(9), 954–964. https://doi.org/10.1086/705591

Carter, C., Shafir, S., Yehonatan, L., Palmer, R. G., & Thornburg, R. (2006). A novel role for proline in plant floral nectars. *Naturwissenschaften*, *93*(2), 72–79. https://doi.org/10.1007/s00114-005-0062-1

Carvell, C., Bourke, A. F. G., Dreier, S., Freeman, S. N., Hulmes, S., Jordan, W. C., Redhead, J. W., Sumner, S., Wang, J., & Heard, M. S. (2017). Bumblebee family lineage survival is enhanced in high-quality landscapes. *Nature*, *543*(7646), 547–549. https://doi.org/10.1038/nature21709

Cook, S. M., Awmack, C. S., Murray, D. A., & Williams, I. H. (2003). Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological*

Entomology, *28*(5), 622–627. https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2003.00548.x

Corbet, S. (2003). Nectar sugar content: Estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie*, *34*(1), 1–10. https://doi.org/10.1051/apido:2002049

de Groot, A. P. (1952). Protein and Amino Acid Requirements of the Honeybee (Apis Mellifera L.)... *Oecologia*, *3*, 197–285.

Descamps, C., Boubnan, N., Jacquemart, A.-L., & Quinet, M. (2021). Growing and Flowering in a Changing Climate: Effects of Higher Temperatures and Drought Stress on the Bee-Pollinated Species Impatiens glandulifera Royle. *Plants*, *10*(5), 988. https://doi.org/10.3390/plants10050988

Descamps, C., Quinet, M., Baijot, A., & Jacquemart, A.-L. (2018). Temperature and water stress affect plant–pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecology and Evolution*, *8*, 3443–3456. https://doi.org/10.1002/ece3.3914

Descamps, C., Quinet, M., & Jacquemart, A.-L. (2021). The effects of drought on plant–pollinator interactions: What to expect? *Environmental and Experimental Botany*, *182*, 104297. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104297

Forrest, J. R. K. (2016). Insect pollinators and climate change. In *Global Climate Change and Terrestrial Invertebrates* (pp. 71–91). Scopus. https://doi.org/10.1002/9781119070894.ch5

Gardener, M. C., & Gillman, M. P. (2001). Analyzing Variability in Nectar Amino Acids: Composition Is Less Variable Than Concentration. *Journal of Chemical Ecology*, *27*(12), 2545–2558. https://doi.org/10.1023/A:1013687701120

Gardener, M. C., & Gillman, M. P. (2002). The Taste of Nectar: A Neglected Area of Pollination Ecology. *Oikos*, *98*(3), 552–557.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(11), 1456–1466. https://doi.org/10.4161/psb.21949

Hedhly, A. (2011). Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany*, *74*, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.03.016

Heil, M. (2011). Nectar: Generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, *16*(4), 191–200. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.01.003

Hendriksma, H. P., Oxman, K. L., & Shafir, S. (2014). Amino acid and carbohydrate tradeoffs by honey bee nectar foragers and their implications for plant–pollinator interactions. *Journal of Insect Physiology*, *69*, 56–64. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.025

Hrassnigg, N., Leonhard, B., & Crailsheim, K. (2003). Free amino acids in the haemolymph of honey bee queens(Apis mellifera L.). *Amino Acids*, *24*(1), 205–212. https://doi.org/10.1007/s00726-002-0311-y

Inouye, D. W., & Waller, G. D. (1984). Responses of Honey Bees (Apis Mellifera) to Amino Acid Solutions Mimicking Floral Nectars. *Ecology*, *65*(2), 618–625. https://doi.org/10.2307/1941424

IPBES. (2016, April 3). *Thematic assessment of pollinators, pollination and food production* [Text]. IPBES. http://www.ipbes.net/publication/thematic-assessment-pollinators-pollination-and-food-production

IPCC. (2018). *Global Warming of 1.5°C, an IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty*. http://ipcc.ch/report/sr15/

Jacquemart, A.-L., Carlier, A., Jeannerod, L., Schatz, B., & Baude, M. (n.d.). *Evaluation of the pollen amino acid nutritional value in temperate European entomophilous plant species*.

Korres, N. E., Norsworthy, J. K., Tehranchian, P., Gitsopoulos, T. K., Loka, D. A., Oosterhuis, D. M., Gealy, D. R., Moss, S. R., Burgos, N. R., Miller, M. R., & Palhano, M. (2016). Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *36*(1), 12. https://doi.org/10.1007/s13593-016-0350-5

Koti, S., Reddy, K. R., Reddy, V. R., Kakani, V. G., & Zhao, D. (2005). Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. *Journal of Experimental Botany*, *56*(412), 725–736. https://doi.org/10.1093/jxb/eri044

Kriesell, L., Hilpert, A., & Leonhardt, S. D. (2017). Different but the same: Bumblebee species collect pollen of different plant sources but similar amino acid profiles. *Apidologie*, *48*(1), 102–116. https://doi.org/10.1007/s13592-016-0454-6

Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., & Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, *6*. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00026

Langlois, A., Jacquemart, A.-L., & Piqueray, J. (2020). Contribution of Extensive Farming Practices to the Supply of Floral Resources for Pollinators. *Insects*, *11*(11), 818. https://doi.org/10.3390/insects11110818

Latty, T., & Trueblood, J. S. (2020). How do insects choose flowers? A review of multi-attribute flower choice and decoy effects in flower-visiting insects. *Journal of Animal Ecology*, *89*(12), 2750–2762. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13347

Lechantre, A., Draux, A., Hua, H.-A. B., Michez, D., Damman, P., & Brau, F. (2021). Essential role of papillae flexibility in nectar capture by bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(19). https://doi.org/10.1073/pnas.2025513118

Lemoine, R., Camera, S. L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J., & Durand, M. (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science*, *4*. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272

Lohaus, G., & Schwerdtfeger, M. (2014). Comparison of Sugars, Iridoid Glycosides and Amino Acids in Nectar and Phloem Sap of Maurandya barclayana, Lophospermum erubescens, and Brassica napus. *PLOS ONE*, *9*(1), e87689. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087689

MacArthur, R. H., & Pianka, E. R. (1966). On Optimal Use of a Patchy Environment. *The American Naturalist*, *100*(916), 603–609. JSTOR.

Mesihovic, A., Iannacone, R., Firon, N., & Fragkostefanakis, S. (2016). Heat stress regimes for the investigation of pollen thermotolerance in crop plants. *Plant*

Reproduction, *29*(1), 93–105. https://doi.org/10.1007/s00497-016-0281-y

Meussen, B. J., van Zeeland, A. N. T., Bruins, M. E., & Sanders, J. P. M. (2014). A Fast and Accurate UPLC Method for Analysis of Proteinogenic Amino Acids. *Food Analytical Methods*, *7*(5), 1047–1055. https://doi.org/10.1007/s12161-013-9712-7

Michener, C. D. (2007). *The bees of the world*. The Johns Hopkins University Press.

Moerman, R., Vanderplanck, M., Fournier, D., Jacquemart, A. L., & Michez, D. (2017). Pollen nutrients better explain bumblebee colony development than pollen diversity. *Insect Conservation and Diversity*, *10*(2), 171–179. https://doi.org/10.1111/icad.12213

Moquet, L., Bacchetta, R., Laurent, E., & Jacquemart, A.-L. (2017). Spatial and temporal variations in floral resource availability affect bumblebee communities in heathlands. *Biodiversity and Conservation*, *26*(3), 687–702. https://doi.org/10.1007/s10531-016-1266-8

Nepi, M., Soligo, C., Nocentini, D., Abate, M., Guarnieri, M., Cai, G., Bini, L., Puglia, M., Bianchi, L., & Pacini, E. (2012). Amino acids and protein profile in floral nectar: Much more than a simple reward. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *207*(7), 475–481. https://doi.org/10.1016/j.flora.2012.06.002

Nicolson, S. W. (2011). Bee food: The chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, *46*(2), 197–204. https://doi.org/10.1080/15627020.2011.11407495

Nicolson, S. W., & Thornburg, R. W. (2007). Nectar chemistry. In *Nectaries and nectar* (pp. 215–264). Springer. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-5937-7_5

Nikkeshi, A., Kuramitsu, K., Yokoi, T., & Yamaji, K. (2021). Simple methods of analyzing proteins and amino acids in small pollen samples. *Journal of Apicultural Research*, *0*(0), 1–7. https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1915633

Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, *120*(3), 321–326.

Pacini, E., & Dolferus, R. (2019). Pollen Developmental Arrest: Maintaining Pollen Fertility in a World With a Changing Climate. *Frontiers in Plant Science*, *10*. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00679

Pandey, P., Ramegowda, V., & Senthil-Kumar, M. (2015). Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: Physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 723. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00723

Parachnowitsch, A. L., Manson, J. S., & Sletvold, N. (2019). Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany*, *123*(2), 247–261. https://doi.org/10.1093/aob/mcy132

Pasquale, G. D., Alaux, C., Conte, Y. L., Odoux, J.-F., Pioz, M., Vaissière, B. E., Belzunces, L. P., & Decourtye, A. (2016). Variations in the Availability of Pollen Resources Affect Honey Bee Health. *PLOS ONE*, *11*(9), e0162818. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162818

Petanidou, T., Laere, A. V., Ellis, W. N., & Smets, E. (2006). What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos*, *115*(1), 155–169. https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14487.x

Phillips, B. B., Shaw, R. F., Holland, M. J., Fry, E. L., Bardgett, R. D., Bullock, J. M., & Osborne, J. L. (2018). Drought reduces floral resources for pollinators. *Global Change Biology*, *24*(7), 3226–3235. https://doi.org/10.1111/gcb.14130

Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, *25*(6), 345–353.

Prasad, P. V. V., Staggenborg, S. A., & Ristic, Z. (2008). Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of Crops to Limited Water: Understanding and Modeling Water Stress Effects on Plant Growth Processes*, 301–355. https://doi.org/10.2134/advagricsystmodel1.c11

Pressman, E., Peet, M. M., & Pharr, D. M. (2002). The Effect of Heat Stress on Tomato Pollen Characteristics is Associated with Changes in Carbohydrate Concentration in the Developing Anthers. *Annals of Botany*, *90*(5), 631–636. https://doi.org/10.1093/aob/mcf240

R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.r-project.org/index.html

Requier, F., Odoux, J.-F., Henry, M., & Bretagnolle, V. (2017). The carry-over effects of pollen shortage decrease the survival of honeybee colonies in farmlands. *Journal of Applied Ecology*, *54*(4), 1161–1170. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12836

Rering, C. C., Franco, J. G., Yeater, K. M., & Mallinger, R. E. (2020). Drought stress alters floral volatiles and reduces floral rewards, pollinator activity, and seed set in a global plant. *Ecosphere*, *11*(9), e03254. https://doi.org/10.1002/ecs2.3254

Roger, N., Michez, D., Wattiez, R., Sheridan, C., & Vanderplanck, M. (2017). Diet effects on bumblebee health. *Journal of Insect Physiology*, *96*, 128–133. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.11.002

Roulston, T. H., & Cane, J. H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, *222*(1), 187–209. https://doi.org/10.1007/BF00984102

Ruedenauer, F. A., Leonhardt, S. D., Lunau, K., & Spaethe, J. (2019). Bumblebees are able to perceive amino acids via chemotactile antennal stimulation. *Journal of Comparative Physiology A*, *205*(3), 321–331. https://doi.org/10.1007/s00359-019-01321-9

Ruedenauer, F. A., Spaethe, J., van der Kooi, C. J., & Leonhardt, S. D. (2019). Pollinator or pedigree: Which factors determine the evolution of pollen nutrients? *Oecologia*, *191*(2), 349–358. https://doi.org/10.1007/s00442-019-04494-x

Scaven, V. L., & Rafferty, N. E. (2013). Physiological effects of climate warming on flowering plants and insect pollinators and potential consequences for their interactions. *Current Zoology*, *59*(3), 418–426.

Scheepens, J. F., Deng, Y., & Bossdorf, O. (2018). Phenotypic plasticity in response to

temperature fluctuations is genetically variable, and relates to climatic variability of origin, in *Arabidopsis thaliana*. *AoB PLANTS*, *10*(4). https://doi.org/10.1093/aobpla/ply043

Sehgal, A., Sita, K., Bhandari, K., Kumar, S., Kumar, J., Prasad, P. V. V., Siddique, K. H. M., & Nayyar, H. (2019). Influence of drought and heat stress, applied independently or in combination during seed development, on qualitative and quantitative aspects of seeds of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes, differing in drought sensitivity. *Plant, Cell & Environment*, *42*(1), 198–211. https://doi.org/10.1111/pce.13328

Settele, J., Bishop, J., & Potts, S. G. (2016). Climate change impacts on pollination. *Nature Plants*, *2*, 16092. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.92

Simanonok, M. P., Otto, C. R. V., & Smart, M. D. (2020). Do the Quality and Quantity of Honey Bee-Collected Pollen Vary Across an Agricultural Land-Use Gradient? *Environmental Entomology*, *49*(1), 189–196. https://doi.org/10.1093/ee/nvz139

Simcock, N. K., Gray, H. E., & Wright, G. A. (2014). Single amino acids in sucrose rewards modulate feeding and associative learning in the honeybee. *Journal of Insect Physiology*, *69*, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.004

Smith, A. R., & Zhao, D. (2016). Sterility Caused by Floral Organ Degeneration and Abiotic Stresses in Arabidopsis and Cereal Grains. *Frontiers in Plant Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01503

Snider, J. L., & Oosterhuis, D. M. (2011). How does timing, duration, and severity of heat stress influence pollen-pistil interactions in angiosperms? *Plant Signaling & Behavior*, *6*(7), 930–933. https://doi.org/10.4161/psb.6.7.15315

Somme, L., Moquet, L., Quinet, M., Vanderplanck, M., Michez, D., Lognay, G., & Jacquemart, A.-L. (2016). Food in a row: Urban trees offer valuable floral resources to pollinating insects. *Urban Ecosystems*, *19*(3), 1149–1161. https://doi.org/10.1007/s11252-016-0555-z

Spinoni, J., Vogt, J. V., Naumann, G., Barbosa, P., & Dosio, A. (2018). Will drought events become more frequent and severe in Europe? *International Journal of Climatology*, *38*(4), 1718–1736. https://doi.org/10.1002/joc.5291

Su, Z., Ma, X., Guo, H., Sukiran, N. L., Guo, B., Assmann, S. M., & Ma, H. (2013). Flower Development under Drought Stress: Morphological and Transcriptomic Analyses Reveal Acute Responses and Long-Term Acclimation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *25*(10), 3785–3807.

Suni, S. S., Ainsworth, B., & Hopkins, R. (2020). Local adaptation mediates floral responses to water limitation in an annual wildflower. *American Journal of Botany*, *107*(2), 209–218. https://doi.org/10.1002/ajb2.1434

Takkis, K., Tscheulin, T., & Petanidou, T. (2018). Differential effects of climate warming on the nectar secretion of early- and late-flowering Mediterranean plants. *Frontiers in Plant Science*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00874

Teulier, L., Weber, J.-M., Crevier, J., & Darveau, C.-A. (2016). Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proceedings: Biological Sciences*, *283*(1834), 1–8.

Thom, M. D., Eberle, C. A., Forcella, F., Gesch, R., Weyers, S., & Lundgren, J. G. (2016). Nectar production in oilseeds: Food for pollinators in an agricultural landscape. *Crop Science*, *56*(2), 727–739. Scopus. https://doi.org/10.2135/cropsci2015.05.0322

Timberlake, T. P., Vaughan, I. P., & Memmott, J. (2019). Phenology of farmland floral resources reveals seasonal gaps in nectar availability for bumblebees. *Journal of Applied Ecology*, *56*(7), 1585–1596. https://doi.org/10.1111/1365-2664.13403

Vanderplanck, M., Leroy, B., Wathelet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidologie*, *45*(2), 192–204. https://doi.org/10.1007/s13592-013-0239-0

Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathelet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees? *PLoS ONE*, *9*(1), e86209. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086209

Vaudo, A. D., Tooker, J. F., Grozinger, C. M., & Patch, H. M. (2015). Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science*, *10*, 133–141. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.008

Venjakob, C., Leonhardt, S., & Klein, A.-M. (2020). Inter-Individual Nectar Chemistry Changes of Field Scabious, Knautia arvensis. *Insects*, *11*(2), 75. https://doi.org/10.3390/insects11020075

Villarreal, A. G., & Freeman, C. E. (1990). Effects of Temperature and Water Stress on Some Floral Nectar Characteristics in Ipomopsis longiflora (Polemoniaceae) under Controlled Conditions. *Botanical Gazette*, *151*(1), 5–9. JSTOR.

Wan, T., Feng, Y., Liang, C., Pan, L., He, L., & Cai, Y. (2021). Metabolomics and Transcriptomics Analyses of Two Contrasting Cherry Rootstocks in Response to Drought Stress. *Biology*, *10*(3), 201. https://doi.org/10.3390/biology10030201

Waser, N. M., & Price, M. V. (2016). Drought, pollen and nectar availability, and pollination success. *Ecology*, *97*(6), 1400–1409. https://doi.org/10.1890/15-1423.1

Weiner, C. N., Hilpert, A., Werner, M., Linsenmair, K. E., & Blüthgen, N. (2010). Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie*, *41*(4), 476–487. https://doi.org/10.1051/apido/2009083

Woodard, S. H., & Jha, S. (2017). Wild bee nutritional ecology: Predicting pollinator population dynamics, movement, and services from floral resources. *Current Opinion in Insect Science*, *21*, 83–90. Scopus. https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.011

6. Supplementary material

Table S1 : Effects of temperature rise and water stress on nectar amino acid concentrations (ng/mg nectar) of *Borago officinalis* 3 weeks after stress induction.

Treatment[5]	21WW	21WS	24WW	24WS	27WW	27WS	Temp[6]	Water	Temp : au
Asparagine[1]	1.40 ± 0.37	5.15± 2.18	3.90 ± 1.55	5.92 ± 2.14	3.45 ± 1.35	5.45 ± 1.45	$F_{2,12}$=0.54; *P*=0.6	$F_{1,12}$=3.83; *P*=0.07	$F_{2,12}$=0.19; *P*=0.82
Glutamine[2]	2.08 ± 0.39	8.13 ± 2.15	6.37 ± 3.52	8.90 ± 3.06	5.70 ± 2.81	9.33 ± 2.38	$F_{2,12}$=0.57; *P*=0.58	$F_{1,12}$=3.46; *P*=0.09	$F_{2,12}$=0.23; *P*=0.8
Cysteine	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	/	/	/
Serine	1.73 ± 0.1	5.13 ± 0.91	8.93 ± 4.25	7.73 ± 1	8.98 ± 3.91	11.02 ± 1.05	$F_{2,12}$=3.45; *P*=0.07	$F_{1,12}$=0.44; *P*=0.52	$F_{2,12}$=0.42; *P*=0.67
Histidine[3]	< LOQ	3.3 ± 0.63	4.48 ± 2.04	3.95 ± 1.57	4.17 ± 0.89	7.35 ± 2.6	$F_{2,12}$=2.34; *P*=0.14	$F_{1,12}$=1.14; *P*=0.31	$F_{1,12}$=1.02; *P*=0.39
Glycine	0.93 ± 0.25	1.58 ± 0.39	5.6 ± 3.95	3.25 ± 1.28	8.33 ± 5.82	2.67 ± 0.75	$F_{2,12}$=0.92; *P*=0.43	$F_{1,12}$=0.86; *P*=0.37	$F_{2,12}$=0.47; *P*=0.63
Threonine[3]	< LOQ	2.01 ± 0.18	5.7 ± 2.86	3.82 ± 0.68	2.6 ± 0.88	4.1 ± 0.31	$F_{2,12}$=3.18; *P*=0.08	$F_{1,12}$=0.01; *P*=0.91	$F_{1,12}$=1.03; *P*=0.39
Arginine[3]	< LOD	1.48 ± 0.4	5.2 ± 1.93	3.42 ± 1.18	2.8 ± 0.59	4.07 ± 1.41	$F_{2,12}$=8.76; ***P*=0.005**	$F_{1,12}$=0.02; *P*=0.88	$F_{1,12}$=2.12; *P*=0.16
Methionine[3,4]	NF	NF	NF	NF	NF	NF	/	/	/
Alanine	1.02 ± 0.11	3.07 ± 0.71	4.88 ± 1.59	3.47 ± 0.43	3.53 ± 0.99	5.60 ± 0.66	$F_{2,12}$=4.18; ***P*=0.04**	$F_{1,12}$=1.37; *P*=0.26	$F_{2,12}$=2.28; *P*=0.15
Tyrosine	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	/	/	/
Valine[3]	< LOQ	1.5 ± 0.39	3.58 ± 1.67	4.78 ± 1.9	3.48 ± 1.13	4.22 ± 1.34	$F_{2,12}$=6.58; ***P*=0.01**	$F_{1,12}$=0.06; *P*=0.94	$F_{1,12}$=0.06; *P*=0.94

Phenylalanine[3]	1.52 ± 0.26	3.18 ± 0.37	2.33 ± 0.29	3.42 ± 0.51	2.37 ± 0.32	3.68 ± 0.28	$F_{2,12}$=2.27; *P*=0.15	$F_{1,12}$=24.87; ***P*<0.001**	$F_{1,12}$=0.39; *P*=0.69
Isoleucine[3]	< LOD	< LOQ	1.55 ± 0.3	< LOQ	< LOQ	1.83 ± 0.15	$F_{2,12}$=3.86; *P*=0.05	$F_{1,12}$=4.26; *P*=0.06	$F_{2,12}$=0.01; *P*=0.99
Leucine[3]	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	$F_{2,12}$=3.19; *P*=0.07	$F_{1,12}$=1.37; *P*=0.26	$F_{2,12}$=0.13; *P*=0.88
Lysine[3]	NF	NF	NF	NF	NF	NF	/	/	/
Proline	5.35 ± 1.36	25.63 ± 6.02	32 ± 5.50	48.38 ± 3.80	31.37 ± 5.54	43.45 ± 5.84	$F_{2,12}$=23.09; ***P*<0.001**	$F_{1,12}$=24.98; ***P*<0.001**	$F_{2,12}$=0.53; *P*=0.60
Hydroxyproline	NF	NF	NF	NF	NF	NF	/	/	/
Total quantity	23.48 ± 2.5	66.03 ± 8.87	90.37 ± 17.73	103.75 ± 7.37	83.22 ± 10.25	107.45 ± 10.66	$F_{2,12}$=17.1; ***P*<0.001**	$F_{1,12}$=10.38; ***P*=0.007**	$F_{2,12}$=1.05; *P*=0.38
EAA	9.33 ± 1.52	15.8 ± 1.62	26.78 ± 5.32	24.2 ± 3.04	20.17 ± 3.23	28.02 ± 3.75	$F_{2,12}$=9.82; ***P*=0.003**	$F_{1,12}$=2.24; *P*=0.16	$F_{1,12}$=1.57; *P*=0.25
nEAA	14.15 ± 1.71	50.23 ± 8.13	63.58 ± 12.71	79.55 ± 5.33	63.05 ± 7.15	79.43 ± 7.64	$F_{2,12}$=20.04; ***P*<0.001**	$F_{1,12}$=15.26; ***P*=0.002**	$F_{2,12}$=1.29; *P*=0.31

[1] Asparagine + aspartic acid ; [2] glutamine + glutamic acid ; [3] essential amino acids ; [4] methionine sulfone ; [5]N=3 (triplicates), data are means ± SE, 21=21°C, 24=24°C, 27=27°C, WW : well-watered, WS : water-stressed, Temp. : temperature effect ; EAA : essential amino acids (De Groot, 1953) ; nEAA : non essential amino acids ; LOD : limit of detection ; LOQ : limit of quantification ; NF : not found.

Table S2 : Effects of temperature rise and water stress on pollen amino acid concentrations (mg/g pollen) of *Borago officinalis* 3 weeks after stress induction

Treatment[5]	21WW	21WS	24WW	24WS	27WW	27WS	Temp	Water	Temp : Water
Asparagine[1]	15.42 ± 2.45	15.01± 2.33	13.49 ± 2.5	10.6 ± 1.01	7.59 ± 0.77	7.92 ± 0.62	$F_{2,24}$=8.73; ***P*=0.001**	$F_{1,24}$=0.46; *P*=0.51	$F_{2,24}$=0.46; *P*=0.64
Glutamine[2]	24.28 ± 4.15	23.45 ± 2.94	19.06 ± 1.45	16.52 ± 1.85	13.78 ± 1.62	14.82 ± 1.05	$F_{2,24}$=8.72; ***P*=0.001**	$F_{1,24}$=0.16; *P*=0.69	$F_{2,24}$=0.32; *P*=0.73
Cysteine	2.35 ± 1.19	3.65± 2.43	1.74 ± 1.09	1.41 ± 0.55	1.34 ± 0.51	1.14 ± 0.55	$F_{2,24}$=1.19; *P*=0.32	$F_{1,24}$=0.05; *P*=0.83	$F_{2,24}$=0.3; *P*=0.75
Serine	15.2 ± 2.08	14.07 ± 1.61	12.73 ± 1.45	11.84 ± 0.43	8.89 ± 0.41	10.18 ± 0.91	$F_{2,24}$=9.45; ***P*<0.001**	$F_{1,24}$=0.1; *P*=0.76	$F_{2,24}$=0.57; *P*=0.57
Histidine[3]	19.32 ± 6.28	22.64 ± 9.22	13.14 ± 3.71	27.66 ± 3.69	20.26 ± 1.79	21.4 ± 1.98	$F_{2,24}$=0.01; *P*=0.99	$F_{1,24}$=2.43; *P*=0.13	$F_{2,24}$=1.09; *P*=0.35
Glycine	42.54 ± 12.5	37.67 ± 11.58	23.94 ± 5.13	48.19 ± 3.66	36.32 ± 1.31	40.61 ± 2.85	$F_{2,24}$=0.14; *P*=0.87	$F_{1,24}$=1.54; *P*=0.23	$F_{2,24}$=1.9; *P*=0.17
Threonine[3]	10.38 ± 2.05	13.12 ± 3.65	8.34± 1.1	11.37 ± 2.77	10.71 ± 2.23	10.68 ± 2.44	$F_{2,24}$=0.54; *P*=0.59	$F_{1,24}$=1.7; *P*=0.21	$F_{2,24}$=0.41; *P*=0.67
Arginine[3]	41.29 ± 17.04	29.59 ± 6.57	16.67 ± 2.99	33.84 ± 5.12	25.88 ± 3.63	31.12 ± 4.66	$F_{2,24}$=1.25; *P*=0.30	$F_{1,24}$=0.45; *P*=0.51	$F_{2,24}$=2.45; *P*=0.11
Methionine[3,4]	9.32 ± 0.54	15.15 ± 1.85	10.38 ± 0.13	10.11 ± 0.93	9.4 ± 1.31	NF	$F_{2,24}$=2.47; *P*=0.11	$F_{1,24}$=1.07; *P*=0.33	$F_{2,24}$=2.07; *P*=0.15
Alanine	15.6 ± 3.82	14.54 ± 3.05	11.83 ± 0.61	10.36 ± 1.66	9.15 ± 0.83	10.38 ± 1.12	$F_{2,24}$=4.1; ***P*=0.03**	$F_{1,24}$=0.09; *P*=0.76	$F_{2,24}$=0.27; *P*=0.77
Tyrosine	3.26 ± 0.4	3.07 ± 0.52	2.6 ± 0.23	2.93 ± 0.5	2.77 ± 0.12	3.02 ± 0.3	$F_{2,24}$=0.93; *P*=0.41	$F_{1,24}$=0.21; *P*=0.65	$F_{2,24}$=0.42; *P*=0.66
Valine[3]	22.03 ± 5.22	17.83 ± 5	10.18 ± 3	9.64 ± 1.38	15.68 ± 12.22	8.75 ± 0.95	$F_{2,24}$=2.66; *P*=0.09	$F_{1,24}$=1.02; *P*=0.32	$F_{2,24}$=0.24; *P*=0.78

Phenylalanine[3]	17.03 ± 5.07	18.31 ± 2.74	12.52 ± 0.78	18.78 ± 2.25	16.11 ± 0.85	18.99 ± 1.66	$F_{2,24}$=0.68; *P*=0.52	$F_{1,24}$=4.65; ***P*=0.04**	$F_{2,24}$=0.85; *P*=0.44
Isoleucine[3]	10.14 ± 1.4	12.05 ± 1.72	8.52 ± 0.73	9.05 ± 0.97	7.37 ± 0.24	7.63 ± 0.87	$F_{2,24}$=8.32; ***P*=0.002**	$F_{1,24}$=1.45; *P*=0.24	$F_{2,24}$=0.53; *P*=0.6
Leucine[3]	26.82 ± 4.6	22.81 ± 2.61	16.75 ± 1.15	18.63 ± 1.73	16.13 ± 0.61	18.13 ± 0.87	$F_{2,24}$=7.74; ***P*=0.003**	$F_{1,24}$=0.01; *P*=0.94	$F_{2,24}$=1.19; *P*=0.32
Lysine[3]	59.82 ± 17.24	53.72 ± 13.04	41.42 ± 8.91	68.81 ± 12.09	47.41 ± 6.48	54.22 ± 6.32	$F_{2,24}$=0.2; *P*=0.82	$F_{1,24}$=1.46; *P*=0.24	$F_{2,24}$=1.6; *P*=0.22
Proline	38.63 ± 24.2	44.41 ± 27.92	22.13 ± 7.12	122.77 ± 14.83	53.5 ± 4.63	53.15 ± 11.24	$F_{2,24}$=0.6; *P*=0.56	$F_{1,24}$=4.39; ***P*=0.05**	$F_{2,24}$=4.23; ***P*=0.03**
Hydroxyproline	4.67 ± 2.76	7.25 ± 3.49	3.25 ± 1.18	16.07 ± 2.39	8.33 ± 1.11	13.14 ± 1.87	$F_{2,23}$=0.98; *P*=0.39	$F_{1,23}$=9.53; ***P*=0.005**	$F_{2,23}$=2.55; *P*=0.1
Total	369.44 ± 76.73	351.94 ± 69.86	235.99 ± 28.61	377.14 ± 53.56	279.69 ± 21.86	300.19 ± 28.81	$F_{2,24}$=1.26; *P*=0.3	$F_{1,24}$=1.65; *P*=0.21	$F_{2,24}$=1.63; *P*=0.22
EAA	216.16 ± 40.62	199.15 ± 34.89	137.91 ± 17.32	205.88 ± 18.98	168.94 ± 15.23	172.32 ± 13.49	$F_{2,24}$=1.47; *P*=0.25	$F_{1,24}$=0.83; *P*=0.37	$F_{1,24}$=1.65; *P*=0.21
nEAA	153.28 ± 40.16	152.8 ± 38.8	98.08 ± 12.37	171.26 ± 36.03	110.75 ± 14.87	127. 87± 18.79	$F_{2,24}$=1.07; *P*=0.36	$F_{1,24}$=2.74; *P*=0.11	$F_{2,24}$=1.5; *P*=0.24

[1] Asparagine + aspartic acid ; [2] glutamine + glutamic acid ; [3] essential amino acids ; [4] methionine sulfone ; [5]N=4 (triplicates), data are means ± SE, 21=21°C, 24=24°C, 27=27°C, WW : well-watered, WS : water-stressed, Temp. : temperature effect ; EAA : essential amino acids (De Groot, 1953) ; nEAA : non essential amino acids ; LOD : limit of detection ; LOQ : limit of quantification ; NF : not found.

Chapter 6 : Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging

Dans le chapitre 6, nous souhaitons approfondir la troisième question de recherche concernant les modifications de comportement de visite des pollinisateurs (Fig. III.2) lorsqu'ils sont face à des plantes « stressées » et contrôles. Ce chapitre a été publié.

Descamps, C.; Jambrek, A.; Quinet, M. & Jacquemart, A.-L. 2021. Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. Insects, 12, 493. https://doi.org/10.3390/insects12060493

Nous avons choisi de nous concentrer sur l'impact de la température, vu l'effet marqué sur les traits floraux et les ressources florales. Nous avons également suivi la production de nectar, puisque celle-ci, au vu des analyses précédentes, était impactée par les stress. Etant donné que la température était légèrement différente par rapport aux précédentes expérimentations (26°C), nous avons mesuré une nouvelle fois certains traits floraux (nombre de fleur, surface des corolles, taille des plantes, quantité de nectar et de pollen) pour avoir une caractérisation des plantes qui soit la plus complète possible avant d'observer le comportement des pollinisateurs en chambre de vol. En particulier, pour le nectar, nous avons mesuré toutes les fleurs de 5 plantes par température, afin de distinguer des différences de secrétion au fur et à mesure de l'anthèse (phase mâle suivie d'une phase femelle). Travailler dans une chambre de vol ainsi qu'avec des ruchettes de bourdons naïfs nous a permis aussi de limiter l'influence d'autres facteurs (Fig. III.3 en annexe), comparé aux suivis qui avaient été réalisés *in natura* (voir chapitre 2). Cette expérience a été réalisée en 2018 avec l'aide de Anne Jambrek (Master biologie). Notre hypothèse était que les bourdons seraient moins attirés par les fleurs des plantes cultivées à 26°C et les visiteraient moins fréquemment comparées à celles cultivées à 21°C.

Les apports de ce chapitre par rapport à la troisième question de recherche sont synthétisés ci-dessous.

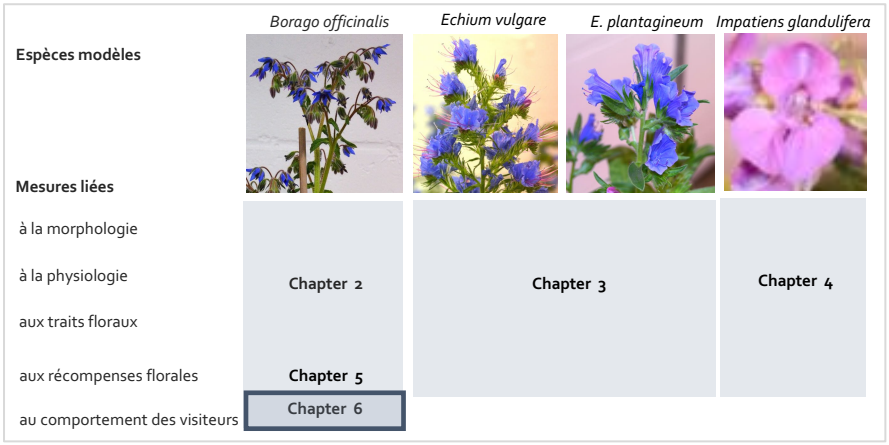


Figure III.2 : Schéma conceptuel de l'organisation des chapitres 2 à 6 de la thèse en fonction des thèmes explorés et des espèces modèles. L'encadré bleu correspond au chapitre d'intérêt.

Ce chapitre 6 nous permet de confirmer que les hausses de température induisent des modifications de signaux floraux et de récompenses florales qui sont perceptibles par les insectes.

Au niveau des signaux visuels, les plantes de 26°C montraient des différences par rapport à celles de 21°C. Leur surface totale de corolles était réduite de 50% (somme de toutes les surfaces de corolles par plante, environ 34 cm^2 à 26°C et 71 cm^2 à 21°C). Par contre, elles présentaient une hauteur de tige supérieure (environ 87 cm à 26°C et 75 cm à 21°C). Concernant les ressources florales, le volume de nectar ainsi que sa concentration en sucres augmentent au cours du développement de la fleur, aussi bien à 21°C qu'à 26°C. Cependant, la hausse de température a affecté négativement le volume de nectar durant la phase femelle ; alors que cette hausse de température n'a pas d'effet sur la concentration. Par conséquent, la quantité de sucres dans le nectar, calculée par fleur, augmente au fur et à mesure du développement de la fleur, mais cette augmentation est moindre durant la phase femelle à 26°C comparativement à l'augmentation à 21°C. A la différence du chapitre 4, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur la quantité de pollen par fleur.

L'expérience nous a permis de suivre les parcours de 34 bourdons ; ceux-ci ont visité 653 fleurs. Le nombre de fleurs visitées par plante était 4 fois supérieur pour les plantes cultivées à 21°C (12 visites par session expérimentale) comparées à celles cultivées à 26°C (3 visites par session expérimentale). La surface totale de corolle et la hauteur des plantes ont été les facteurs qui ont influencé significativement le choix de visite. Les bourdons n'ont pas changé de comportement de récolte (nectar et/ou pollen récolté) ni modifié le temps passé par fleur lors de la collecte de ressources. Les séquences de vol ont été relativement constantes, suivant l'indicateur calculé sur base des séquences de vol ($C_{O/E}$) qui compare les séquences de vol réelles à des séquences aléatoires.

Lorsqu'ils font face à des plantes stressées et à des plantes contrôles, ils s'orientent de préférence vers les plantes contrôles. Cette expérience plus standardisée confirme ce que nous avions observé sur le terrain lors de la première expérience en 2015, lors de laquelle les insectes visitaient deux fois plus les plantes contrôles par rapport aux plantes issues des autres traitements (voir chapitre 2).

Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging

Charlotte Descamps[1*], Anne Jambrek[1], Muriel Quinet[2], Anne-Laure Jacquemart[1]

Earth and Life Institute– Agronomy, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Correspondence : Charlotte Descamps, email: charlotte.descamps@uclouvain.be

Descamps, C.; Jambrek, A.; Quinet, M. & Jacquemart, A.-L. 2021. Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. Insects, 12, 493. https://doi.org/10.3390/insects12060493

Abstract

Simple Summary: In the context of climate warming, modifications in plant pollination and reproductive success constitute a crucial issue. Modifications of both floral signals (display, size of flowers) and rewards (nectar and pollen) due to increased air temperatures may affect plant–pollinator interactions. However, relationships between modifications in floral traits and rewards caused by increased air temperatures and the associated effects on pollinator visitation rate and foraging behavior have not been thoroughly investigated. To explore the effects of temperature increase on plant–pollinator interactions, we chose the highly attractive bee-pollinated *Borago officinalis* and one of its pollinators, *Bombus terrestris*. We measured visual floral signals and rewards for plants cultivated at 21 °C or 26 °C and we investigated bumblebee behavior by tracking insect visits on plants in an indoor flight arena. Our results show that exposure to higher temperature during the flowering stages of *B. officinalis* negatively affects visual floral traits (e.g., by reducing the number of flowers) as well as floral rewards, affecting bumblebee visitation and foraging behavior. Bumblebees visited flowers from plants grown at 26 °C four times less frequently than they visited those from plants grown at 21 °C. Thus, the global increases in temperature caused by climate change could reduce plant pollination rates and reproductive success by reducing flower visitation.

Abstract: (1) Background: Plants attract pollinators using several visual signals, mainly involving the display, size, shape, and color of flowers. Each signal is relevant for pollinators foraging for floral rewards, pollen, and nectar. Changes in floral signals and rewards can be induced by an increase in temperature, drought, or other abiotic stresses and are expected to increase as global temperatures rise. In this study, we explored how pollinators respond to modified floral signals and rewards following an increase in temperature; (2) Methods: We tested the effects of warmer temperatures on bee-pollinated starflower (*Borago officinalis,* Boraginaceae) and determined the behavior of one of its main pollinators, the buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*). We measured visual floral traits (display and size) and rewards (nectar and pollen) for plants cultivated at 21 °C or 26 °C. We investigated bumblebee behavior by tracking insect visits in a binary choice experiment in an indoor flight arena; (3) Results: Plants cultivated at 26 °C exhibited a smaller floral area (i.e., corolla sizes summed for all flowers per plant, 34.4 ± 2.3 cm^2 versus 71.2 ± 2.7 cm^2) and a greater flower height (i.e., height of the last inflorescence on the stem, 87 ± 1 cm versus 75 ± 1 cm) compared to plants grown at 21 °C. Nectar production per flower was lower in plants grown at 26 °C than in plants grown at 21 °C (2.67 ± 0.37 μL versus 4.15 ± 0.22 μL), and bumblebees visited flowers from plants grown at 26 °C four times less frequently than they visited those from plants grown at 21 °C ; (4) Conclusions: These results show that warmer temperatures affect floral signals and reduce overall floral resources accessible to pollinators. Thus, the global increases in temperature caused by climate change could reduce plant pollination rates and reproductive success by reducing flower visitation.

Keywords : bumblebees; floral signals; flower size; nectar; plant–pollinator interactions; pollen; temperature rise

1. Introduction

Declining pollinator abundance and diversity is a major source of concern for biodiversity in the context of global climate change [1,2]. Worldwide, a large proportion of plants depends on pollinators, mostly insects, for their reproduction, and the fraction of crops cultivated for human consumption and needing pollinator activity continues to rise [3–5]. Climate change can influence how insects interact with flowers by modifying floral signals and rewards [6,7]. Understanding the processes that strongly affect species behavior in the face of climate change is a major challenge in conservation ecology [8].

Higher air temperatures affect both the vegetative growth and the reproductive development of flowering plants [9–13], with the former generally less sensitive to temperature than the latter. The allocation of resources to reproductive organs may be limited, reducing the production of flowers and affecting flower morphology and fertility [14,15]. However, the temperature at which the plant is subjected to stress is specific to each plant species [10,16,17].

Plants attract pollinators to their flowers using several signals, including flower display, size, shape, color, and odor [18–23]. Each signal is relevant for pollinators foraging for floral rewards, pollen, and nectar [24], as pollinators often exhibit innate preferences [25]. Flowers provide floral rewards in exchange for the transfer and deposition of pollen onto pollinators, which promotes reproductive success of pollinated plants [26]. For pollinators, pollen is a rich source of proteins and lipids, while nectar constitutes the main source of sugars [27,28]. Most bees (Anthophila) depend exclusively on these floral rewards for food supply and can adjust their foraging behavior (e.g., moving to a different flower patch) as a function of the quality of available floral rewards [29].

According to the optimal foraging theory [30], pollinators seek to maximize the quantity of food they collect when out foraging, while minimizing their energy expenditure. Flight is energetically costly, and possible rewards from each outing are difficult to predict. The quantity of pollen and nectar varies over time and space [26]. If a flower contains little or no reward, the visit represents a waste of time and energy. Accordingly, pollinators have learned to recognize flowers that offer large rewards [31,32]. Visual signals are particularly decisive in this choice for insect visitors [33]. Pollen and nectar composition (e.g., sugars, amino acids, polypeptides, sterols) determine the nutritional value of floral rewards for pollinators, and high nutritional values are preferred [32,34–39].

In the context of global climate change, abiotic stresses such as drought and heat stress are modifying plant–pollinator interactions. For example, pollinators visit flowers from plants suffering from water scarcity less frequently than they visit those of well-watered

plants due to the significant decrease in floral visual signals, such as flower number, size, and corolla tube length, in drought-stressed plants [40–42]. Increased air temperatures also modify flower signals [17], reducing the number and size of flowers in several entomophilous species [43,44]. Floral rewards also decrease at higher temperature, as measured by a reduction in volume or sugar content of nectar per flower [45–47]. In addition, pollen development, and thus fertility and viability, is negatively affected by heat stress [11,48].

Modifications of both floral signals and rewards due to elevated temperatures may affect plant–pollinator interactions, causing morphological and/or recognition mismatches between the two partners [7]. However, relationships between the changes in visual floral traits and floral rewards caused by higher temperatures and the associated effects on pollinator behavior have not been thoroughly investigated. To explore the effects of temperature on pollinator behavior, we chose the highly attractive plant species starflower (*Borago officinalis*) and one of its major pollinators, the buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*). As visual floral traits and rewards are reduced by higher temperatures in *B. officinalis* [49], we sought to document and characterize the possible changes in visitation and foraging behavior of bumblebees to flowers exposed to a temperature increase of 5 °C. We grew plants at 21 °C or at 26 °C, under otherwise identical controlled conditions in growth chambers. We measured visual floral signals and floral rewards in the two groups of plants. We then presented each group of plants to bumblebees in an indoor flight arena. We investigated bumblebee behavior by tracking insect visits in a binary choice test to flowers from plants grown at 21 °C versus 26 °C. We hypothesized that bumblebees would be less attracted to the flowers of plants grown at 26 °C and visit them less often compared to flowers of plants grown at 21 °C.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Starflower (*B. officinalis*) is an annual, entomophilous plant mainly pollinated by bumblebees and honeybees [50]. Among bumblebees, *B. terrestris* is a frequent visitor of *B. officinalis* [51].

The flowering period extends from June to September, and about 100 flowers are produced per plant. The flowers, grouped in scorpioid cymes, are hermaphroditic, 5-merous, and protandrous. Their petal color changes from pink to blue during anthesis, which lasts about 3 days. The male phase lasts 1 day, followed by the female phase, which lasts 2 days. Four stages of flower development were distinguished for the experiment (Figure 1).

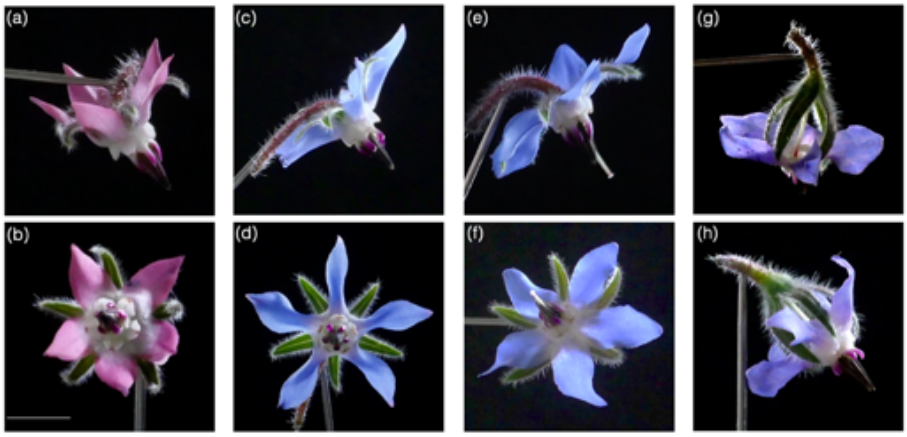


Figure 1. Flower development during anthesis. (**a**,**b**) Stage 1, male phase just after flower opening, with pink or purple petals. (**c**,**d**) Stage 2, transition to female phase with blue petals and stigma inserted. (**e**,**f**) Stage 3, flower with blue petals and protruded receptive stigma. (**g**,**h**) Stage 4, wilting flower before petal abscission. Scale bar, 10 mm.

2.2. Insects

We used three colonies of naïve bumblebees, *B. terrestris*, from BioBest Biological Systems (Westerlo, Belgium). Each colony consisted of about 100 workers. The bumblebees had ad libitum access to a nectar solution (Bio-Gluc, BioBest Biological Systems, Westerlo, Belgium), until 2 days before and during the experiments, to motivate them to forage. Polyfloral pollen (Ballot-Flurin, Couteret, France) was also distributed ad libitum.

2.3. Experimental plant growth conditions

B. officinalis seeds were provided by Semailles (Faulx-les-Tombes, Belgique). Seedlings at the three-leaf stage were transplanted into 2-L pots filled with a 1:1 (*v*/*v*) mix of sand (size 0/5, M PRO, The Netherlands) and universal peat compost (DCM, Amsterdam, Netherlands) and grown in the greenhouses on the University campus (SEFY platform, Louvain-la-Neuve, Belgium). The plants were watered every 2 days with rainwater.

One hundred plants were cultivated. The two different temperature regimes were imposed on *B. officinalis* plants at floral transition, 7 weeks after sowing, when a flowering stem has developed, and the first floral buds are visible. The plants were subjected to one of two temperature regimes (day/night, 21 °C/19 °C and 26 °C/24 °C) in two growth chambers. Relative humidity was similar in the two growth chambers (80%). The plants were monitored for 4 weeks before experiments with bumblebees. The selection of temperature and stress duration was based on previous study to obtain plants at full boom with visible impact of temperature rise [49].

2.4. Visual floral trait and flower reward measurements

2.4.1. Visual signals

To test the effects of a higher growth temperature on plant attractiveness, we measured four floral signals. On observation day, the total number of flowers per plant was counted. Flowers were marked with a water-based marker in order to estimate bumblebee visits per session. After each session of bumblebee visits, all flowers were cut and scanned. We estimated their size by scan analysis using ImageJ software [52]. We calculated floral area per plant, which is the sum of all corolla surfaces per plant, and flower height, defined as the height of the last inflorescence on the main flowering stem.

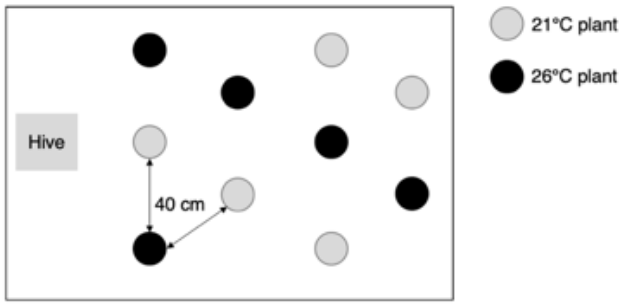
2.4.2. Floral resources

Floral resources were measured on five plants per temperature regime, which were not later used for choice experiments with bumblebees. The nectar was extracted with 10-µL glass capillary tubes (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany) from 190 flowers (43 flowers at stage 1, 55 flowers at stage 2, 47 flowers at stage 3 and 55 flowers at stage 4). The flower position along the flowering stem and the stage/phase of flower anthesis was recorded. The total sugar concentration (C, g sucrose/100 g solution) was measured with a low-volume hand refractometer (Eclipse handheld refractometer; Bellingham and Stanley, Tunbridge Wells, UK). Nectar sugar content per flower (s, mg) was calculated as $s = 10 \times d \times v \times C$, where d is the density of a sucrose solution at concentration C ($d = 0.0037921 \times C + 0.0000178 \times C^2 + 0.9988603$) and v is nectar volume (mL) [53]. Pollen production per flower was estimated based on pollen collected from five plants for each temperature regime (total of 66 flowers at stage 2; Figure 1b). The pollen was collected by squeezing and opening anthers with pliers over a microfuge tube. Each pollen sample was weighed to estimate pollen fresh weight (mg) per flower.

2.5. Experimental design of plant–insect interactions

We recorded the behavior of bumblebees visiting plants from the two temperature regime groups. We performed experiments in an indoor flight arena (2.1 m high × 2.8 m long × 2.2 m wide). For each experimental session, we selected ten plants, five plants grown at 21 °C and five plants grown at 26 °C, for 4 weeks before exposure to bumblebees (see 2.3 for plant growing conditions). We arranged plants 40 cm apart to reduce effects from variation in interplant distance on bumblebee movements (Supplementary Figure S1). We carried out nine experimental sessions. The position of the plants (plants grown at 21 °C vs. plants grown 26 °C) was changed between each session to avoid the bumblebees learning the position of the plants. For a same session, all the plants of a same treatment had a similar number of flowers at the same developmental stage. For each plant used for the experimental sessions, we recorded the stage of development of each flower. Since the flowers remain for a very short time in stage 1, and by stage 4 they are almost senescent and fall off the plant, we only considered

flowers in stages 2 and 3 for floral resources. We considered the average nectar and pollen quantity for these stages and assigned these values to each flower for the floral resource assessment.



Supplementary Figure 1. Experimental design for bumblebee behavior observations. The black rectangle represents the flight arena where 10 plants were placed.

2.6. Training phase and visiting observations

Before the experiment, bumblebees were allowed to become accustomed to the flight arena and with the flowers for 3 h. During this training phase, one hive was open, and bumblebees were allowed to move freely.

During each experimental session, we released five bumblebees, one by one, in the flight arena, so that only one bumblebee was present in the flight arena at any given time. One observer noted the visiting sequence by bumblebees and their behavior. Each time that a bumblebee probed a flower was recorded as a visit by the observer. Each visit was timed; the visited plant and the visited flower were also noted. Pollinator feeding behavior was recorded, when possible, as "nectar feeding", "pollen feeding", or "nectar and pollen feeding". More than 3 min was generally necessary for each bumblebee to start visiting flowers. After 20 min of observation, behavior recording was stopped, and the bumblebee captured. Sessions were terminated when bumblebees spent more than 10 min not foraging. All observed bumblebees during each experimental session were replaced in the hive at the end of the session. New plants were used for each session and the position of the plants grown at 21 °C or 26 °C in the flight arena was changed between each session.

2.7. Statistical analyses

Analysis of variance (type I) was performed with a significance level of $p < 0.05$ to evaluate the effects of higher temperature on flower height and on the number of open flowers per plant. Linear mixed models were applied to analyze corolla surface (repeated measurements on the same plant) with one fixed factor (temperature) and plants as the repeated factor. Linear mixed models were used to analyze nectar production (repeated measurements on the same plant) with two fixed factors (temperature and flower

developmental stage) and plants as the random factor. Normality of residuals was estimated using QQ plots and homoscedasticity was verified. Tukey's test was performed for post hoc analyses.

To determine whether bumblebee visit choice was affected by modifications in visual floral traits (flower height, floral area, corolla surface, and number of open flowers) and rewards (nectar volume, concentration, and pollen production), we built a generalized linear model with a binomial distribution. We checked collinearity of the residuals of the model using variance inflation factor (VIF) value (all VIF values were below 5, showing no collinearity between predictors). We used a boxcox transformation ($\lambda = -0.14$) for time spent on a flower for data normality to analyze the influence of modifications to visual floral traits and rewards on time spent on a flower. We generated linear mixed models with visual floral traits and rewards as fixed factor and bumblebee individuals as a random factor. Then, we performed $\chi 2$ tests to compare feeding behavior on flowers from plants grown at 21 °C (21-flowers) and on those from plants grown at 26 °C (26-flowers). We summarized the data in a two-entry table with temperature (21 °C and 26 °C) and foraging behaviour (nectar, pollen, and nectar + pollen).

We followed the model developed by Ishii [54] to analyze bumblebee visitation sequences. We first excluded bumblebee sequences with less than five visits and took only into account the first ten visits. The frequency of visits to 21-flowers and to 26-flowers was estimated by dividing the number of visits on each flower type by the total number of visits made during the sequence (between five and ten visits). Then, we calculated the proportion of constant flight as the number of constant flights during a sequence (flight from 21-flower to 21-flower or flight from 26-flower to 26-flower) divided by the total number of flights during a sequence (between four and nine, N–1 visits). Ishii [54] defined a coefficient that compares observed and expected numbers of constant flights ($C_{O/E}$). When this parameter is larger than 1, constant flight occurred more often than expected when the sequence of visits is randomly allocated between 21-flowers and 26-flowers.

All analyses were performed in R (version 3.6.1, [55]), using the *car* package for F test, *lme4* package for linear mixed models, *performance* package for collinearity, and *yarr* and *ggplot2* packages for plots. Data are presented as means ± standard errors (SEs) as boxplots and with raw data points included in light gray.

3. Results

3.1. Effects of higher temperature on plant attractiveness

3.1.1. Floral traits

Growing plants at higher temperature (26 °C versus 21 °C) induced the elongation of the main flowering stem, as measured by flower height (Figure 2a; $F_{1,88}$ = 21.48, p <0.001) but significantly reduced the number of open flowers per plant (Figure 2b; $F_{1,88}$ = 22.79, p < 0.001), as well as total floral area (i.e., all the corolla surfaces summed up for a plant ; Figure 2c; $F_{1,77}$ = 54.98, p < 0.001) and corolla size (Figure 2d; $F_{1,909}$ = 153.8, p < 0.001).

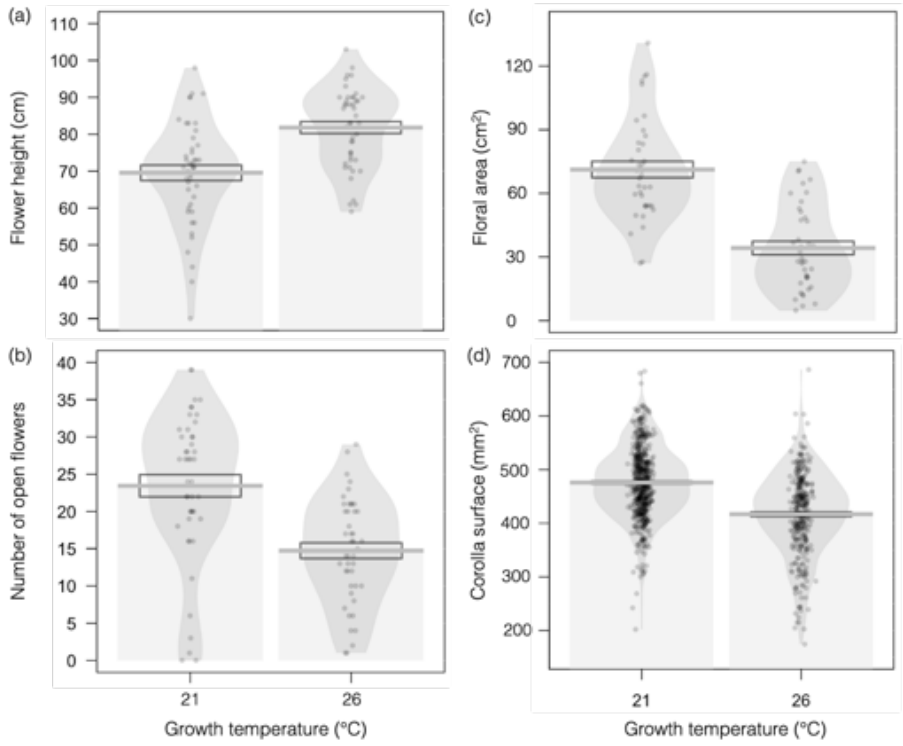


Figure 2. Effects of higher temperature on the visual floral traits of Borago officinalis. (**a**) Flower height (N = 88); (**b**) number of open flowers (N = 88); (**c**) floral area, as defined by the sum of all corolla surfaces per plant (N = 77); and (**d**) corolla surface (N = 909) in plants grown at 21 °C (left-side plots) or 26 °C (right-side plots). Data are presented as means ± standard errors (SEs) as boxplots and with raw data points included in light gray.

3.1.2. Floral rewards

Flowers accumulated nectar throughout their development at both 26 °C and 21 °C, starting at flower opening, as evidenced by increasing nectar volume (Figure 3a; $F_{3,154}$ =

165.86, $p < 0.001$) and total sugar concentration (Figure 3c; $F_{3,157} = 74.60$, $p < 0.001$). Higher temperature negatively affected nectar volume produced per flower during the female phase (Figure 3b; $F_{1,13} = 11.07$, $p = 0.005$), although total sugar concentration remained unchanged (Figure 3d; $F_{1,13} = 1.72$, $p = 0.21$).

These results indicate that the amount of sugar per flower increased as the flowers developed (Figure 3e; $F_{3,154} = 214.69$, $p < 0.001$) but that the increase was less at the higher temperature (Figure 3f; $F_{1,13} = 12.44$, $p = 0.004$) during stages 3 and 4 (interaction effect: $F_{1,155} = 16.07$, $p < 0.001$).

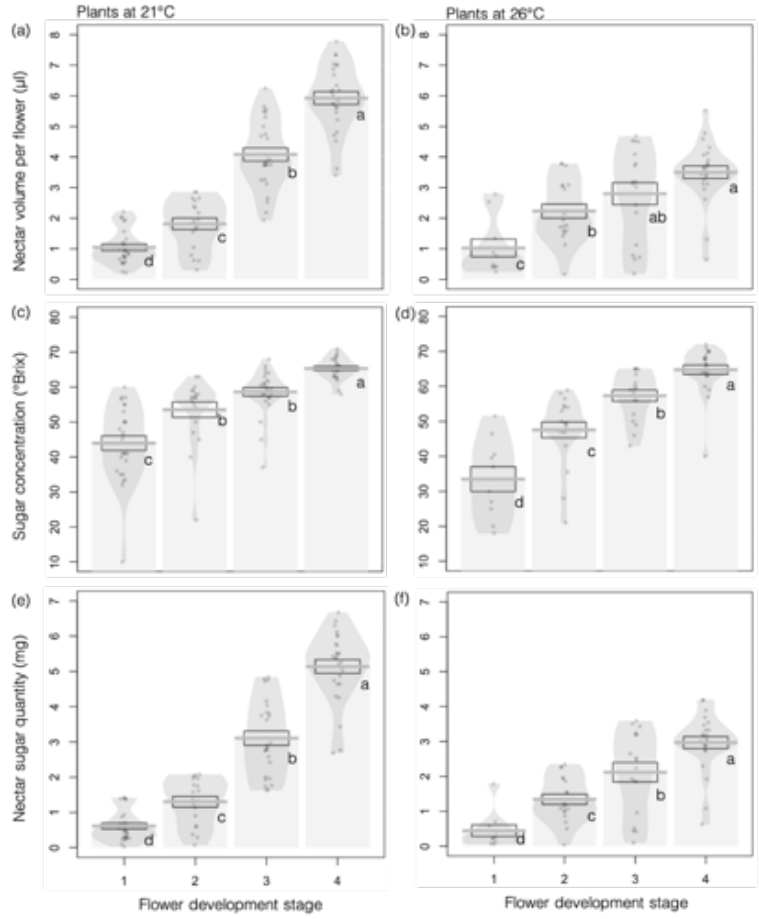


Figure 3. Effects of higher temperature on nectar production in *Borago officinalis*. (**a**,**b**) Nectar volume per flower (N = 178); (**c**,**d**) sugar concentration of nectar; and (**e**,**f**) total amount of nectar sugar (N = 173 for c–f) at the various flower developmental stages of plants grown at 21 °C (**a**,**c**,**e**) or 26 °C (**b**,**d**,**f**). Data are presented as means ± standard errors (SEs) as boxplots and with raw data points included in light gray.

We observed no significant effects of higher temperature on pollen production (1.02 ± 0.09 mg per flower at 21 °C versus 0.83 ± 0.05 mg per flower at 26 °C; $F_{1,8} = 3.67$; $p = 0.09$).

3.2. Effects of higher temperature on plant–insect interactions

We analyzed 34 bumblebee visiting sequences, corresponding to 653 flower visits. We pooled all sequences and discovered that bumblebee individuals visited 518 flowers from plants grown at 21 °C and 135 flowers from plants grown at 26 °C. The number of flowers visited per plant was 4 times greater for plants grown at 21 °C than for plants grown at 26 °C (12 ± 2 versus 3 ± 1 visits per experimental session; Figure 4a).

The choice to visit a flower was significantly predicted by flower height ($\chi^2 = 15.84$, df = 875, $p < 0.001$) and floral area ($\chi^2 = 8.93$, df = 874, $p = 0.003$) but not by corolla surface ($\chi^2 = 2.42$, df = 877, $p = 0.12$), the number of flowers per plant ($\chi^2 = 3.27$, df = 876, $p = 0.07$), nectar volume ($\chi^2 = 1.33$, df = 873, $p = 0.25$), nectar concentration ($\chi^2 = 1.48$, df = 872, $p = 0.22$), or pollen production ($\chi^2 = 3.28$, df = 871, $p = 0.07$).

Bumblebees, however, visited individual flowers for the same amount of time regardless of plant growth conditions (Figure 4b) and exhibited similar foraging behavior ($\chi^2 = 1.58$, df = 2, $p = 0.45$). Indeed, bumblebees visited 19% and 25% of the flowers for nectar foraging, 18% and 21% for pollen foraging and 63% and 54% for both nectar and pollen foraging, on flowers of plants grown at 21 °C and 26 °C, respectively.

Only 6 of 34 bumblebees visited a flower from a plant grown at 26 °C first; all others visited a flower from a plant grown at 21 °C first (Figure 4c). These six individuals then switched to flowers from plants grown at 21 °C for their second and third visits (*data not shown*). Bumblebee visitation sequences showed constancy, especially for flowers from plants grown at 21 °C, as both the proportion of constant flights and the relative frequency of visits to flowers from plants grown at 21 °C were higher than 0.5 (Figure 4d). In most cases (25 of 31), the $C_{O/E}$ was larger than 1 (points were above the 1-$C_{O/E}$ line), indicating higher constancy than expected from a random sequence of visits

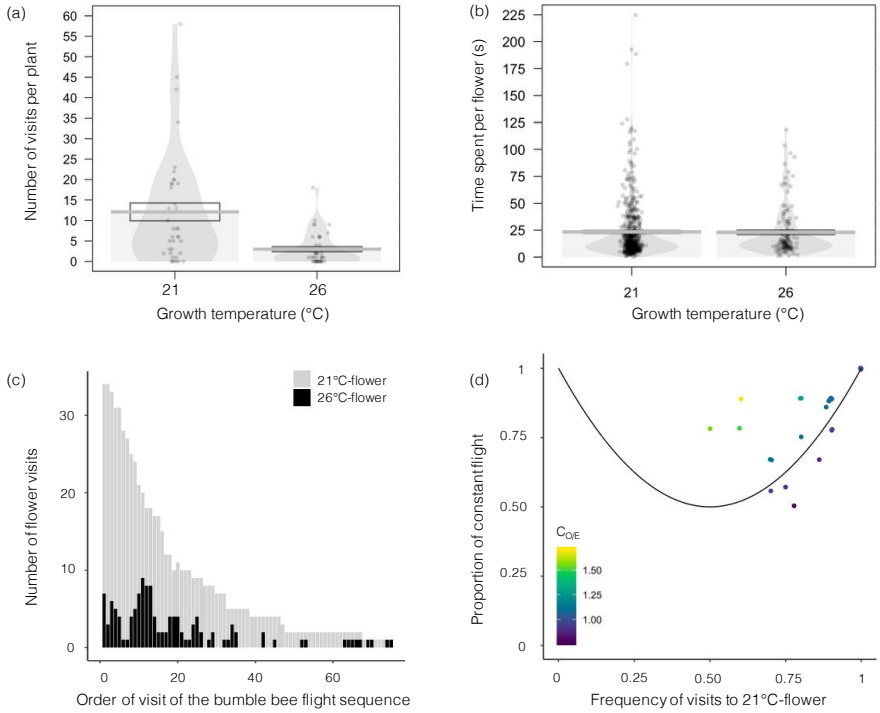


Figure 4. Effects of temperature on bumblebee visits to *Borago officinalis* flowers. (**a**) Number of flowers visited per plant (N = 60); (**b**) time spent per flower visit (N = 653); (**c**) number of flowers of plants grown at 21 °C or 26 °C that were visited according to the order of visit in each flight sequence (sum of all bumblebees flight sequences, N = 34 sequences); and (**d**) proportion of constant flights (from a flower from a plant grown at 21 °C (or 26 °C) to another flower from a plant grown at 21 °C (or 26 °C), divided by the total number of flights) in relation with the proportion of visits to flowers from plants grown at 21 °C. The $C_{O/E}$ coefficient equals 1 along the black line (a sequence above this line, with a $C_{O/E}$ larger than 1, will show more constancy than expected by chance).

4. Discussion

Our results show that exposure to higher temperature during the flowering stages of *B. officinalis* negatively affects visual floral traits as well as floral rewards, affecting bumblebee visitation and foraging behavior.

An increase of 5 °C in plant growth temperature decreased both the total number of flowers per plant and their size, resulting in reduced floral area. Plant phenotypic changes were the consequence of this change in temperature [49,56]. Our results are in agreement with other studies that reported fewer flowers at higher temperature [57,58], although the magnitude of the effect depends on the tolerance of the species (see [59]). Plants grown at 26 °C grew taller (+12%) compared to plants grown at 21 °C in our experiment. Again, at higher temperature, flower height on the main stem can be higher or lower than in plants grown at lower temperature, as a function of plant thermotolerance. Liu et al.

[57] observed that a modest (1.5 °C) increase in temperature induced by open top chambers resulted in an increase of flower height for six insect-pollinated species of eight tested. However, a more substantial rise in temperature imposes heat stress and may reduce flower height. For example, exposure of rapeseed (*Brassica napus*) to a temperature of 28 °C for 10 days reduced height by 15% relative to plants maintained at 22 °C [60]. For *B. officinalis*, the higher temperature of 26 °C may initially promote plant growth and drive the observed greater floral height, due to a stimulation of the vegetative growth [49], before limiting later development during flowering, decreasing the number and size of flowers. The optimal temperature for reproductive growth was indeed lower than for vegetative growth in this species [49].

In addition to these modified visual signals, the quantity of floral resources per flower also diminished in response to the 5 °C increase in growth temperature. Higher temperatures impose physiological stress on plants (see [17] and [49] for *B. officinalis)* that may decrease nectar and pollen production per flower [47,61,62]. Nectar secretion is species-specific, and the optimal temperature at which nectar secretion is highest may differ greatly between species [47]. In our experiment, we observed a 50% reduction in nectar volume between plants grown at 26 °C and 21 °C so that the amount of sugar available in nectar per flower decreased with temperature rise. However, pollen production was not significantly affected by the increase in temperature to 26 °C relative to 21 °C under our experimental setup. As the most sensitive stage during pollen grain development is pollen maturation [48], we hypothesize that higher temperatures may negatively influence pollen quality, such as pollen protein content, even if pollen production is quantitatively unchanged. Indeed, we previously observed that temperature rise decreased pollen viability and pollen size in *B. officinalis* [49], suggesting a decrease in pollen quality. Insect visitors can detect such changes in quality and modify their foraging accordingly [24,38], which would reinforce the attractiveness of flowers from plants grown at 21 °C. Despite lower floral rewards per flower at 26 °C, we did not notice any difference in pollinator foraging behavior or time spent foraging per flower. Bees will thus obtain less flower rewards when visiting a flower of plants grown at 26 °C compared to plants grown at 21 °C.

In our experiment, bumblebees foraged on flowers from plants grown at 21 °C with high constancy when given the choice between plants grown at 21 °C or 26 °C. Flowers of plants grown at 21 °C were also more visited and were the first choice of 80% of the bumblebees. Altogether, these results show that bumblebees prefer flowers from plants grown at 21 °C. Flowers from plants grown at 21 °C covered a larger floral area and were placed more compactly along the main stem compared to plants grown at 26 °C. As the floral area is generally considered to be a strong predictor of bee visits [63,64], the smaller floral area at 26 °C may negatively affect the number of visits per plant, which was confirmed by our observations. Rowe et al. [64] suggested that bees use floral area to gauge the nutritional composition of floral resources. Shorter main flowering stems may also reduce the number of visits, since taller plants may be more attractive and visible to pollinators [17,65], although we did not observe more visits to the taller plants grown at

26 °C, which were not particularly more conspicuous than plants grown at 21 °C. Taken together, our results suggest that flowers from plants grown at 26 °C were less attractive to pollinators than flowers from plants grown at 21 °C, even though the changes in signals are contradictory (e.g., a larger floral area enhanced flower attractiveness at 21 °C, although the shorter plants grown at 21ºC are thought to be less attractive). When faced with complex choices with contradictory signals, bees tend to simplify the decision by ignoring some information and focusing on a single signal [66,67].

The cost of foraging (e.g., ratio between energy use and energy intake during foraging, [67]) on plants grown at 26 °C might be higher than that of foraging on plants grown at 21 °C in our experiment as each bumblebee could collect maximum 50% less sugar at 26 °C despite spending the same amount of time per flower. Furthermore, pollinators, especially those depending on flower resources as their sole food source, are threatened when these resources decrease in response to a rise in temperature. The availability of floral resources is a major limiting factor of bee survival in a natural context [28,68].

Plant attractiveness is a complex phenomenon in which several signals converge and interact; while nectar and pollen serve as a reward, the size, shape, smell, and color of a flower serve as an advertisement [33,69,70]. In this study, we took into account only visual signals and rewards, but the choice of visits may also be influenced by other parameters such as flower scent, which may itself be influenced by the higher temperature conditions. Furthermore, foraging decisions result from interactions between innate preference, constancy, choice set composition, cost of foraging and social information, and each of these components interact [67,71,72]. In our experiment, rather than modifying one signal, we opted to study the consequences of changing several floral signals and rewards at once to obtain a more realistic picture of multi-attribute choices compared to oversimplified single-attribute choices that do not reflect reality [67]. However, even if our experimental setup might be more realistic, we remain in an artificial context where insects do not have access to other sources of data such as social information, which are crucial in shaping their decisions.

We observed a strong preference and constancy for 21 °C flowers by bumblebees, based on an analysis of their flight patterns. By changing floral signals and rewards, rising temperatures induced by climate change may have negative consequences for both partners in the plant–insect relationship. Decreasing visitation of plants grown at 26 °C could reduce the frequency of pollen transfer, thus compromising potentially plant reproduction. In addition, lower floral resources or higher foraging cost would have negative nutritional consequences for bees. Despite these negative consequences for both partners, studies on pollinator behavior modifications due to climate change are still rare and should be expanded to other plant–pollinator models.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Experimental design for bumblebee behavior observations.

Author Contributions: Conceptualization, A.L.J. and C.D.; methodology, A.J. and C.D.; formal analysis, A.J. and C.D.; investigation, A.J. and C.D; data curation, A.J. and C.D.; writing—original draft preparation, C.D..; writing—review and editing, C.D., A.L.J and M.Q..; supervision, A.L.J and M.Q.; project administration, A.L.J and M.Q.; funding acquisition, A.L.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Experimental design for bumblebee behavior observations.

Author Contributions: Conceptualization, A.-L.J. and C.D.; methodology, A.J. and C.D.; formal analysis, A.J. and C.D.; investigation, A.J. and C.D.; data curation, A.J. and C.D.; writing—original draft preparation, C.D.; writing—review and editing, C.D., A.-L.J. and M.Q.; supervision, A.-L.J. and M.Q.; project administration, A.-L.J. and M.Q.; funding acquisition, A.-L.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank C. Buyens for technical assistance, P. Ouvrard for the construction of the flight arena, and M. Migon for providing and monitoring the growth chambers (SEFY platform, UCLouvain). Thanks to Plant Editors (K. Farquharson, J. Mach, N. Hofmann) for language improvement. We also thank Laura Moquet for her comments on the manuscript. This research was the subject of a MS thesis (A. Jambrek) and part of a PhD thesis (C. Descamps).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

5. References

1. IPBES. Thematic Assessment of Pollinators, Pollination and Food Production. Available online: http://www.ipbes.net/publication/thematic-assessment-pollinators-pollination-and-food-production (accessed on 29 November 2016).

2. Soroye, P.; Newbold, T.; Kerr, J. Climate Change Contributes to Widespread Declines among Bumble Bees across Continents. *Science* **2020**, *367*, 685–688, doi:10.1126/science.aax8591.
3. Klein, A.-M.; Vaissiere, B.E.; Cane, J.H.; Steffan-Dewenter, I.; Cunningham, S.A.; Kremen, C.; Tscharntke, T. Importance of Pollinators in Changing Landscapes for World Crops. *Proc. Royal Soc. B Biol. Sci.* **2007**, *274*, 303–313.
4. Ollerton, J.; Winfree, R.; Tarrant, S. How Many Flowering Plants Are Pollinated by Animals? *Oikos* **2011**, *120*, 321–326.
5. Aizen, M.A.; Aguiar, S.; Biesmeijer, J.C.; Garibaldi, L.A.; Inouye, D.W.; Jung, C.; Martins, D.J.; Medel, R.; Morales, C.L.; Ngo, H.; et al. Global Agricultural Productivity Is Threatened by Increasing Pollinator Dependence without a Parallel Increase in Crop Diversification. *Glob. Chang. Biol.* **2019**, *25*, 3516–3527, doi:10.1111/gcb.14736.
6. Ogilvie, J.E.; Griffin, S.R.; Gezon, Z.J.; Inouye, B.D.; Underwood, N.; Inouye, D.W.; Irwin, R.E. Interannual Bumble Bee Abundance Is Driven by Indirect Climate Effects on Floral Resource Phenology. *Ecol. Lett.* **2017**, *20*, 1507–1515, doi:10.1111/ele.12854.
7. Gérard, M.; Vanderplanck, M.; Wood, T.; Michez, D. Global Warming and Plant–Pollinator Mismatches. *Emerg. Top Life Sci.* **2020**, doi:10.1042/ETLS20190139.
8. Urban, M.C. Accelerating Extinction Risk from Climate Change. *Science* **2015**, *348*, 571–573, doi:10.1126/science.aaa4984.
9. Hatfield, J.L.; Prueger, J.H. Temperature Extremes: Effect on Plant Growth and Development. *Weather Clim. Extrem.* **2015**, *10*, 4–10, doi:10.1016/j.wace.2015.08.001.
10. Korres, N.E.; Norsworthy, J.K.; Tehranchian, P.; Gitsopoulos, T.K.; Loka, D.A.; Oosterhuis, D.M.; Gealy, D.R.; Moss, S.R.; Burgos, N.R.; Miller, M.R.; et al. Cultivars to Face Climate Change Effects on Crops and Weeds: A Review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 12, doi:10.1007/s13593-016-0350-5.
11. Hedhly, A. Sensitivity of Flowering Plant Gametophytes to Temperature Fluctuations. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *74*, 9–16, doi:10.1016/j.envexpbot.2011.03.016.
12. Aubert, L.; Konrádová, D.; Kebbas, S.; Barris, S.; Quinet, M. Comparison of High Temperature Resistance in Two Buckwheat Species Fagopyrum Esculentum and Fagopyrum Tataricum. *J. Plant Physiol.* **2020**, *251*, 153222, doi:10.1016/j.jplph.2020.153222.
13. Barnabás, B.; Jäger, K.; Fehér, A. The Effect of Drought and Heat Stress on Reproductive Processes in Cereals. *Plant Cell Environ.* **2008**, *31*, 11–38, doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x.
14. Liu, Y.-H.; Offler, C.E.; Ruan, Y.-L. Regulation of Fruit and Seed Response to Heat and Drought by Sugars as Nutrients and Signals. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, doi:10.3389/fpls.2013.00282.
15. Lemoine, R.; Camera, S.L.; Atanassova, R.; Dédaldéchamp, F.; Allario, T.; Pourtau, N.; Bonnemain, J.-L.; Laloi, M.; Coutos-Thévenot, P.; Maurousset, L.;

et al. Source-to-Sink Transport of Sugar and Regulation by Environmental Factors. *Front Plant Sci.* **2013**, *4*, doi:10.3389/fpls.2013.00272.
16. Prasad, P.V.V.; Staggenborg, S.A.; Ristic, Z. Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants. *Response Crops Ltd. Water Underst. Modeling Water Stress Effects Plant Growth Process.* **2008**, 301–355, doi:10.2134/advagricsystmodel1.c11.
17. Scaven, V.L.; Rafferty, N.E. Physiological Effects of Climate Warming on Flowering Plants and Insect Pollinators and Potential Consequences for Their Interactions. *Curr. Zool.* **2013**, *59*, 418–426.
18. Chittka, L.; Raine, N.E. Recognition of Flowers by Pollinators. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 428–435, doi:10.1016/j.pbi.2006.05.002.
19. Wright, G.A.; Schiestl, F.P. The Evolution of Floral Scent: The Influence of Olfactory Learning by Insect Pollinators on the Honest Signalling of Floral Rewards. *Funct. Ecol.* **2009**, *23*, 841–851.
20. Leonard, A.S.; Dornhaus, A.; Papaj, D.R. Forget-Me-Not: Complex Floral Displays, Inter-Signal Interactions, and Pollinator Cognition. *Curr. Zool.* **2011**, *57*, 215–224, doi:10.1093/czoolo/57.2.215.
21. Knauer, A.C.; Schiestl, F.P. Bees Use Honest Floral Signals as Indicators of Reward When Visiting Flowers. *Ecol. Lett.* **2015**, *18*, 135–143, doi:10.1111/ele.12386.
22. Ruxton, G.D.; Schaefer, H.M. Floral Colour Change as a Potential Signal to Pollinators. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2016**, *32*, 96–100, doi:10.1016/j.pbi.2016.06.021.
23. Sprayberry, J.D.H. The Prevalence of Olfactory- versus Visual-Signal Encounter by Searching Bumblebees. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14590, doi:10.1038/s41598-018-32897-y.
24. Fowler, R.E.; Rotheray, E.L.; Goulson, D. Floral Abundance and Resource Quality Influence Pollinator Choice. *Insect Conserv. Divers.* **2016**, *9*, 481–494, doi:10.1111/icad.12197.
25. Junker, R.R.; Parachnowitsch, A.L. Working towards a Holistic View on Flower Traits-How Floral Scents Mediate Plant-Animal Interactions in Concert with Other Floral Characters. *J. Indian Inst. Sci.* **2015**, *95*, 43–67.
26. Goulson, D. *Bumblebees: Behaviour, Ecology, and Conservation*; Oxford University Press, Oxford, UK, 2010.
27. Nicolson, S.W.; Thornburg, R.W. Nectar chemistry. In *Nectaries and Nectar*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; pp. 215–264.
28. Vaudo, A.D.; Tooker, J.F.; Grozinger, C.M.; Patch, H.M. Bee Nutrition and Floral Resource Restoration. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2015**, *10*, 133–141, doi:10.1016/j.cois.2015.05.008.
29. Cnaani, J.; Thomson, J.D.; Papaj, D.R. Flower Choice and Learning in Foraging Bumblebees: Effects of Variation in Nectar Volume and Concentration. *Ethology* **2006**, *112*, 278–285.
30. MacArthur, R.H.; Pianka, E.R. On Optimal Use of a Patchy Environment. *Am. Nat.* **1966**, *100*, 603–609.

31. Jones, P.L.; Ryan, M.J.; Chittka, L. The Influence of Past Experience with Flower Reward Quality on Social Learning in Bumblebees. *Anim. Behav.* **2015**, *101*, 11–18, doi:10.1016/j.anbehav.2014.12.016.
32. Zhao, Z.; Lu, N.; Conner, J.K. Adaptive Pattern of Nectar Volume within Inflorescences: Bumblebee Foraging Behavior and Pollinator-Mediated Natural Selection. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep34499.
33. Gumbert, A. Color Choices by Bumble Bees (Bombus Terrestris): Innate Preferences and Generalization after Learning. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2000**, *48*, 36–43, doi:10.1007/s002650000213.
34. Cartar, R.V. Resource Tracking by Bumble Bees: Responses to Plant-Level Differences in Quality. *Ecology* **2004**, *85*, 2764–2771, doi:10.1890/03-0484.
35. Kudo, G.; Harder, L.D. Floral and Inflorescence Effects on Variation in Pollen Removal and Seed Production among Six Legume Species. *Funct. Ecol.* **2005**, *19*, 245–254, doi:10.1111/j.1365-2435.2005.00961.x.
36. Larsson, M.; Franzén, M. Critical Resource Levels of Pollen for the Declining Bee Andrena Hattorfiana (Hymenoptera, Andrenidae). *Biol. Conserv.* **2007**, *134*, 405–414, doi:10.1016/j.biocon.2006.08.030.
37. Wallisdevries, M.F.; Van Swaay, C.A.M.; Plate, C.L. Changes in Nectar Supply: A Possible Cause of Widespread Butterfly Decline. *Curr. Zool.* **2012**, *58*, 384–391.
38. Somme, L.; Vanderplanck, M.; Michez, D.; Lombaerde, I.; Moerman, R.; Wathelet, B.; Wattiez, R.; Lognay, G.; Jacquemart, A.-L. Pollen and Nectar Quality Drive the Major and Minor Floral Choices of Bumble Bees. *Apidologie* **2014**, *46*, 92–106, doi:10.1007/s13592-014-0307-0.
39. Bailes, E.J.; Ollerton, J.; Pattrick, J.G.; Glover, B.J. How Can an Understanding of Plant–Pollinator Interactions Contribute to Global Food Security? *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *26*, 72–79, doi:10.1016/j.pbi.2015.06.002.
40. Höfer, R.J.; Ayasse, M.; Kuppler, J. Bumblebee Behavior on Flowers, but Not Initial Attraction, Is Altered by Short-Term Drought Stress. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fpls.2020.564802.
41. Kuppler, J.; Wieland, J.; Junker, R.R.; Ayasse, M. Drought-Induced Reduction in Flower Size and Abundance Correlates with Reduced Flower Visits by Bumble Bees. *AoB Plants* **2021**, doi:10.1093/aobpla/plab001.
42. Descamps, C.; Quinet, M.; Jacquemart, A.-L. The Effects of Drought on Plant–Pollinator Interactions: What to Expect? *Environ. Exp. Bot.* **2021**, *182*, 104297, doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104297.
43. Zinn, K.E.; Tunc-Ozdemir, M.; Harper, J.F. Temperature Stress and Plant Sexual Reproduction: Uncovering the Weakest Links. *J. Exp. Bot.* **2010**, 61, 1959–1968.
44. Mu, J.; Peng, Y.; Xi, X.; Wu, X.; Li, G.; Niklas, K.J.; Sun, S. Artificial Asymmetric Warming Reduces Nectar Yield in a Tibetan Alpine Species of Asteraceae. *Ann. Bot.* **2015**, *116*, 899–906, doi:10.1093/aob/mcv042.

45. Petanidou, T.; Smets, E. Does Temperature Stress Induce Nectar Secretion in Mediterranean Plants? *New Phytol.* **1996**, *133*, 513–518, doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb01919.x.
46. Pacini, E.; Nepi, M.; Vesprini, J.L. Nectar Biodiversity: A Short Review. *Plant Syst. Evol.* **2003**, *238*, 7–21, doi:10.1007/s00606-002-0277-y.
47. Takkis, K.; Tscheulin, T.; Tsalkatis, P.; Petanidou, T. Climate Change Reduces Nectar Secretion in Two Common Mediterranean Plants. *AoB Plants* **2015**, *7*, plv111.
48. Mesihovic, A.; Iannacone, R.; Firon, N.; Fragkostefanakis, S. Heat Stress Regimes for the Investigation of Pollen Thermotolerance in Crop Plants. *Plant Reprod* **2016**, *29*, 93–105, doi:10.1007/s00497-016-0281-y.
49. Descamps, C.; Quinet, M.; Baijot, A.; Jacquemart, A.-L. Temperature and Water Stress Affect Plant–Pollinator Interactions in *Borago Officinalis* (Boraginaceae). *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 3443–3456, doi:10.1002/ece3.3914.
50. Thom, M.D.; Eberle, C.A.; Forcella, F.; Gesch, R.; Weyers, S.; Lundgren, J.G. Nectar Production in Oilseeds: Food for Pollinators in an Agricultural Landscape. *Crop Sci.* **2016**, *56*, 727–739, doi:10.2135/cropsci2015.05.0322.
51. Baijot, A. *Etude Des Impacts Du Stress Hydrique et de Hausses de Temp´eratures Sur Les Ressources Florales de La Bourrache (Borago Officinalis) et Des r´epercussions Possibles Sur Les Relations Plantes-Pollinisateurs*; 2016. Faculté des Bioingénieurs, Louvain-la-Neuve, Belgique.
52. Abramoff, M.D.; Magalhães, P.J.; Ram, S.J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **2004**, *11*, 36–42.
53. Prys-Jones, O.E.; Corbet, S.A. *Naturalists' Handbooks 6: Bumblebees*; Richmond Publishing Compagny, Slough, UK, 1991.
54. Ishii, H.S. Analysis of Bumblebee Visitation Sequences within Single Bouts: Implication of the Overstrike Effect on Short-Term Memory. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2005**, *57*, 599–610, doi:10.1007/s00265-004-0889-z.
55. Team, R.C. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, 2020.
56. Brunet, J.; Van Etten, M.L. The Response of Floral Traits Associated with Pollinator Attraction to Environmental Changes Expected under Anthropogenic Climate Change in High-Altitude Habitats. *Int. J. Plant Sci.* **2019**, *180*, 954–964, doi:10.1086/705591.
57. Liu, Y.; Mu, J.; Niklas, K.J.; Li, G.; Sun, S. Global Warming Reduces Plant Reproductive Output for Temperate Multi-Inflorescence Species on the Tibetan Plateau. *New Phytol.* **2012**, *195*, 427–436, doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04178.x.
58. Takkis, K.; Tscheulin, T.; Petanidou, T. Differential Effects of Climate Warming on the Nectar Secretion of Early- and Late-Flowering Mediterranean Plants. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fpls.2018.00874.
59. Descamps, C.; Marée, S.; Hugon, S.; Quinet, M.; Jacquemart, A.-L. Species-Specific Responses to Combined Water Stress and Increasing Temperatures in

Two Bee-Pollinated Congeners (Echium, Boraginaceae). *Ecol. Evol.* **2020**, *10*, 6549-6561 doi:10.1002/ece3.6389.
60. Qaderi, M.M.; Kurepin, L.V.; Reid, D.M. Effects of Temperature and Watering Regime on Growth, Gas Exchange and Abscisic Acid Content of Canola (Brassica Napus) Seedlings. *Environ. Exp. Bot.* **2012**, *75*, 107–113, doi:10.1016/j.envexpbot.2011.09.003.
61. Porch, T.G.; Jahn, M. Effects of High-Temperature Stress on Microsporogenesis in Heat-Sensitive and Heat-Tolerant Genotypes of Phaseolus Vulgaris. *Plant Cell Environ.* **2001**, *24*, 723–731, doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00716.x.
62. Paupière, M.J.; Müller, F.; Li, H.; Rieu, I.; Tikunov, Y.M.; Visser, R.G.F.; Bovy, A.G. Untargeted Metabolomic Analysis of Tomato Pollen Development and Heat Stress Response. *Plant Reprod* **2017**, *30*, 81–94, doi:10.1007/s00497-017-0301-6.
63. Potts, S.G.; Vulliamy, B.; Dafni, A.; Ne'eman, G.; Willmer, P. Linking Bees and Flowers: How Do Floral Communities Structure Pollinator Communities? *Ecology* **2003**, *84*, 2628–2642, doi:10.1890/02-0136.
64. Rowe, L.; Gibson, D.; Bahlai, C.A.; Gibbs, J.; Landis, D.A.; Isaacs, R. Flower Traits Associated with the Visitation Patterns of Bees. *Oecologia* **2020**, *193*, 511–522, doi:10.1007/s00442-020-04674-0.
65. Ouvrard, P.; Transon, J.; Jacquemart, A.-L. Flower-Strip Agri-Environment Schemes Provide Diverse and Valuable Summer Flower Resources for Pollinating Insects. *Biodivers Conserv.* **2018**, *27*, 2193–2216, doi:10.1007/s10531-018-1531-0.
66. Cakmak, I.; Sanderson, C.; Blocker, T.D.; Lisa Pham, L.; Checotah, S.; Norman, A.A.; Harader-Pate, B.K.; Tyler Reidenbaugh, R.; Nenchev, P.; Barthell, J.F.; et al. Different Solutions by Bees to a Foraging Problem. *Anim. Behav.* **2009**, *77*, 1273–1280, doi:10.1016/j.anbehav.2009.01.032.
67. Latty, T.; Trueblood, J.S. How Do Insects Choose Flowers? A Review of Multi-Attribute Flower Choice and Decoy Effects in Flower-Visiting Insects. *J. Anim. Ecol.* **2020**, *89*, 2750–2762, doi:10.1111/1365-2656.13347.
68. Carvell, C.; Bourke, A.F.G.; Dreier, S.; Freeman, S.N.; Hulmes, S.; Jordan, W.C.; Redhead, J.W.; Sumner, S.; Wang, J.; Heard, M.S. Bumblebee Family Lineage Survival Is Enhanced in High-Quality Landscapes. *Nature* **2017**, *543*, 547–549, doi:10.1038/nature21709.
69. Raguso, R.A. Why Do Flowers Smell? The Chemical Ecology of Fragrance-Driven Pollination. *Adv. Insect Chem. Ecol.* **2004**, 151–178.
70. Leonard, A.S.; Masek, P. Multisensory Integration of Colors and Scents: Insights from Bees and Flowers. *J. Comp. Physiol. A* **2014**, *200*, 463–474.
71. Leadbeater, E.; Chittka, L. Social Learning in Insects—From Miniature Brains to Consensus Building. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, R703–R713, doi:10.1016/j.cub.2007.06.012.

72. Austin, M.W.; Horack, P.; Dunlap, A.S. Choice in a Floral Marketplace: The Role of Complexity in Bumble Bee Decision-Making. *Behav. Ecol.* **2019**, *30*, 500–508, doi:10.1093/beheco/ary190.



Figure III.3 : Dispositif dans la chambre de vol, les plantes de *B. officinalis* sont réparties de manière aléatoire dans la chambre de vol.

Partie IV : Discussion générale

La thèse a permis de mettre en évidence que les effets d'une hausse de température et d'un stress hydrique affectent plus particulièrement le développement reproducteur des plantes, par rapport au développement végétatif. La combinaison de ces stress affecte le développement reproducteur de manière directe, mais aussi de manière indirecte par une limitation des capacités photosynthétiques. Ces modifications du développement reproducteur ont des conséquences potentielles sur les pollinisateurs, à travers une altération des signaux visuels et une limitation des ressouces florales (Fig.1).

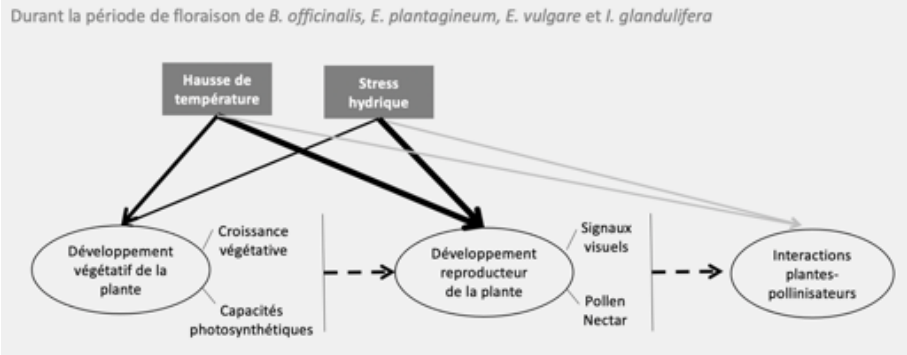


Figure 5 : Schéma conceptuel de l'influence d'une hausse de température et d'un stress hydrique sur le développement végétatif et reproducteur de la plante et les conséquences potentielles sur les interactions avec les pollinisateurs pour les quatre espèces entomophiles étudiées (*B. officinalis, E. plantagineum, E. vulgare, I. glandulifera).* L'épaisseur du trait des flèches est liée à l'importance de l'impact (impact faible, moyen, fort en fonction du nombre de paramètres affectés et de leur variation), le trait plein correspond à une influence directe, le trait pointillé à une influence indirecte. Les traits noirs correspondent à des effets qui ont été mesurés, les traits gris correspondent à des effets qui n'ont pas été mesurés.

1. Effets additifs de la hausse de température et du stress hydrique

Cette thèse a permis de montrer que la température et le stress hydrique n'ont pas affecté de la même manière le développement végétatif par rapport au développement reproducteur pour les quatre espèces investiguées, *B. officinalis*, *E. vulgare*, *E. plantagineum* et *I. glandulifera*. Ces 4 espèces sont des espèces entomophiles hautement attractives pour les pollinisateurs. Trois d'entre-elles appartiennent à la famille des Boraginaceae (*B. officinalis*, *E. vulgare*, *E. plantagineum*) et la 4ème appartient à la famille des Balsaminaceae. Elles sont en outre annuelles excepté *E. vulgare*, qui est bisannuelle.

Les traits végétatifs et physiologiques ont globalement été plus affectés par la hausse de température que par le stress hydrique tandis que les deux facteurs ont eu une influence marquée sur le développement reproducteur des plantes, notamment sur les traits floraux (Tab. 1). Le développement végétatif et reproducteur des plantes peuvent être affectés différemment par les hausses de température et par le stress hydrique (Duan *et al.* 2017; Cohen *et al.* 2021). Par rapport à ce constat général, on peut toutefois noter que *E. vulgare,* espèce bisannuelle, est l'espèce qui a été la moins affectée par les stress (Tab. 1).

Lorsqu'à la fois la température et le stress hydrique influençaient la réponse de la plante, leurs effets indépendants s'additionnaient, renforçant en général le caractère délétère de la combinaison des deux stress sur les réponses de la plante. Nous n'avons observé que très peu d'effets d'interaction entre les deux stress sur les paramètres mesurés. Les effets de la combinaison d'une hausse de température et du stress hydrique sont généralement rapportés comme étant additifs chez de nombreuses espèces (Zandalinas *et al.* 2018). Selon le paramètre observé, la combinaison des deux stress peut aussi produire un effet plus important que si les stress étaient appliqués individuellement (Barnabás *et al.* 2008; Pandey *et al.* 2015; Sehgal *et al.* 2019). La combinaison de stress peut donner lieu, d'un point de vue métabolique, a une réponse unique qui diffère de la simple superposition de deux stress appliqués individuellement (Orians *et al.* 2019); cela a été observé, par exemple, sur *Nicotiana tabacum* (Rizhsky *et al.* 2002). Il a été montré que l'expression des gènes impliqués dans un stress individuel n'est pas la même que dans le cas d'une combinaison de stress (Rizhsky *et al.* 2002).

Tableau 1 : Synthèse des résultats obtenu sur les 4 espèces étudiées (liste non exhaustive des paramètres mesurés). Temp. : effet de la hausse de température ; eau : effet du stress hydrique ; + : valeur du paramètre qui augmente significativement avec l'influence du stress ; ^ : valeur maximum du paramètre observé à 24°C ; - : valeur du paramètre qui diminue significativement avec l'influence du stress ; 0 : pas d'effet significatif du stress ; cellule grisée : paramètre non mesuré ; (E)AA : acides aminés (essentiels) ; FM : matière fraîche

	B. officinalis		*E. plantagineum*		*E. vulgare*		*I. glandulifera*	
	Temp.	Eau	Temp.	Eau	Temp.	Eau	Temp.	Eau
Croissance végétative								
Nombre de feuilles	-	-	-	-	-	0	0	-
Hauteur des plantes (cm)	^	0	0	-	0	0	0	0
Nombre de rameaux axillaires	+	+	0	-	0	0		
Capacités photosynthétiques								
Teneur en chlorophylle	^	0	-	0	0	-	0	0
Efficacité du photosystème II	-	0	-	0	-	0	0	-
Non photochemical quenching (NPQ)	0	0	+	0	0	0	0	0
Conductance stomatique ($mmol.m^{-2}.s^{-1}$)	^	0	-	-	^	0	-	0
Taux photosynthèse (A_i ; $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$)	+	0	0	-	0	-		
Taux transpiration (E_i ; $mmol.m^{-2}.s^{-1}$)	^	-	-/+	-	0	-		
Water use efficiency (WUE_i)	+	+	^	+	-	0		
Sucres solubles totaux ($g.g^{-1}$ FM)							+	-
Développement reproducteur								
Nombre de fleurs par plante	0	-	^	-	0	-	0	-
Longueur /profondeur corolle (cm)	-	-	-	-	-	-	-	0
Diamètre corolle (cm)			-	-	-	-	0	-
Surface corolle (cm^2)	-	-	-	-	0	-		
Ressources florales								
Volume de nectar (µl)	-	-	-	-	0	0	-	-
Concentration en sucres nectar (°Brix)	-/+	0	-	-	0	0	-	0
Quantité de sucres dans le nectar (mg)	-	-	-	-	0	0	-	-
Concentration AA nectar (ng/mg nectar)	+	+						
EAA nectar percentage (%)	+	0						
Quantité de pollen (nombre grains)	0	0			-	-	-	0
Quantité de pollen (poids par fleur)	0	-						
Viabilité du pollen (%)	-	-	0	0	^	NA	-	0
Concentration polypeptides pollen (µg/mg pollen)	+	0					-	0
Concentration AA pollen (mg/g pollen)	0	0						
EAA pollen percentage (%)	0	0						

Les plantes présentent différentes stratégies de réponses aux stress, ce qui implique que leur réponse peut varier face à une même contrainte (Pandey *et al.* 2015; Zhou *et al.* 2017; Amuji *et al.* 2020). Par exemple, l'espèce bisannuelle *E. vulgare,* semblait mieux tolérer l'augmentation de la température et le stress hydrique que l'espèce annuelle *E. plantagineum* (Tab.1). Des différences de stratégie face aux stress abiotiques entre les plantes pérennes-bisannuelles et les plantes annuelles ont été observées précédemment sur 3 espèces d'*Arabidopsis* face à un stress hydrique (Bouzid *et al.* 2019). Les plantes annuelles (*A. thalinia* dans l'étude de Bouzid *et al.,* 2019) ont eu tendance à échapper aux contraintes abiotiques (c'est-à-dire accélerer leur développement pour éviter la période de stress) alors que les plantes bisannuelles et pérennes ont développé principalement des stratégies de tolérance (c'est-à-dire maintenir leur développement malgré les stress, via des ajustements au niveau moléculaire), bien que ces stratégies n'aient pas été pas exclusives (Kooyers 2015; Bouzid *et al.* 2019). De plus, l'ampleur des changements phénotypiques (végétatifs et reproducteurs) était plus importante chez *E. plantagineum,* espèce annuelle, par rapport à *E. vulgare,* espèce bisannuelle dans notre expérience. Bien que la plasticité phénotypique soit un avantage crucial pour les plantes dans le contexte des changements climatiques afin qu'elles puissent s'adapter à de nouvelles conditions environnementales (Nicotra *et al.* 2010; Lázaro-Nogal *et al.* 2015), l'ampleur de la variation de certains caractères comme la réduction de la taille des fleurs pose question en terme d'adéquation morphologique avec les insectes pollinisateurs. D'après une étude de synthèse sur les effets des changements environnementaux sur la flore méditerranéenne, les espèces herbacées annuelles, surtout celles ayant des exigences hydriques élevées (en particulier les hydrophytes), ont eu tendance à régresser comparé aux espèces herbacées pérennes, aux arbres ou aux espèces à graines dispersées par le vent, qui ont eu tendance à augmenter significativement au niveau de leur abondance au cours du siècle dernier (Lavergne *et al.* 2006).

2. Adaptation du développement végétatif

2.1. Sénescence foliaire et modification de l'architecture des plantes

En réponse à la hausse de température et au stress hydrique, nous avons observé une sénescence foliaire marquée chez les 4 espèces, allant jusqu'à une diminution de 50% du nombre de feuilles, 3 semaines après le début des stress. Cet effet est régulièrement observé chez d'autres espèces en réponse au stress thermique et/ou hydrique (Connor and Jones 1985; Xu and Huang 2007; Prasad *et al.* 2008; Wu *et al.* 2010; Sivakumar and Srividhya 2016). La sénescence des feuilles est induite par l'éthylène, phytohormone dont la biosynthèse est stimulée par la sécheresse et par les hausses de température (Firon *et al.* 2012; Bartoli *et al.* 2013).

Principaux groupes d'hormones végétales et principales actions (Taiz *et al.* 2015)

- Auxines : interviennent dans toutes les étapes de la croissance et du développement des plantes (dès les premiers stades de l'embryogenèse puis au niveau des méristèmes apicaux), dans le phototropisme et le gravitropisme.
- Cytokinines : interviennent aussi dans les processus de division cellulaire et de croissance (action conjointe avec les auxines), dans la sénescence foliaire et la mobilisation des éléments nutritifs.
- Gibbérellines : interviennent dans la germination des graines, la transition florale et le développement du pollen.
- Ethylène : intervient dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques, dans le processus de floraison, de maturation des fruits et de sénescence.
- Acide abscissique : intervient dans la régulation de l'ouverture des stomates, dans la dormance des graines et dans la sénescence foliaire.

En réduisant le nombre de feuilles, la plante diminue sa surface de transpiration et donc son besoin en eau (Souza *et al.* 1997). Dans notre dispositif expérimental, les plantes étaient mises en conditions de stress au moment de leur floraison, les feuilles sur la tige principale étaient pour la plupart bien développées. La sénescence a été particulièrement marquée sur ces feuilles matures. Par contre, chez les espèces annuelles (*B. officinalis, E. plantagineum* et *I. glandulifera*), parallèlement à cette sénescence, les plantes ont initié de nouveaux rameaux axillaires et de nouvelles feuilles sur ces rameaux. Le développement de rameaux axillaires en réponse à des contraintes abiotiques a déjà été rapporté (Boutraa and Sanders 2001; Mathieu *et al.* 2014) et peut être associé à une levée de la dominance apicale, associée au moment de la transition florale (Bernier *et al.* 1981). Par ailleurs, nous avons observé que l'effet du stress hydrique sur le développement des feuilles des rameaux axillaires était différent suivant les espèces : alors que le stress hydrique a augmenté l'initiation foliaire chez *B. officinalis,* il a diminué ou ralenti cette initiation chez *E. plantagineum* et *I. glandulifera.* La température a eu un effet positif sur cette initiation de feuilles jusqu'à 24°C pour *B. officinalis*, jusqu'à 27°C pour *E. plantagineum* ; alors qu'elle n'a pas eu d'effet chez *I. glandulifera*. Il a été montré que l'augmentation des températures peut favoriser le développement des feuilles jusqu'à une température optimale spécifique à l'espèce (Gray and Brady 2016). L'architecture des plantes étaient dès lors modifiée par le développement de ces rameaux axillaires.

Cette modification de l'architecture de la plante va également impacter la taille des plantes. Suivant l'espèce, l'impact sur la croissance en hauteur de la plante était différent. Le stress hydrique a diminué la croissance de *E. plantagineum*, mais cette dernière n'a pas été affectée par la hausse des températures. Au contraire, la température de 24°C a favorisé la croissance de *B. officinalis* ; le stress hydrique ne l'a par contre pas affectée. Il n'y a pas eu d'effet des stress sur la croissance en hauteur de *E. vulgare* et *I. glandulifera*. Le stress hydrique peut induire une diminution du taux de croissance (Prasad *et al.* 2008; Qaderi *et al.* 2012; Vile *et al.* 2012). La température, tant qu'elle ne dépasse pas le seuil optimal particulier à l'espèce, peut avoir un effet positif, entre autres, sur la croissance en

hauteur, étant donné que la température favorise la croissance jusqu'à un certain niveau spécifique à l'espèce. *B. officinalis* a bien toléré la température de 24°C dans notre expérience ; l'effet délétère de la température ne s'est marqué qu'à partir de 27°C pour la croissance végétative. Ces conditions n'ont pas affecté la croissance de *I. glandulifera* car les plantes étaient déjà à un stade de croissance plus avancé que les autres espèces lors de l'application du stress. *Impatiens glandulifera* a une tige qui porte successivement les feuilles et puis les inflorescences sur des nœuds différents et sur les ramifications (Vervoort *et al.* 2011), donc tant le nombre de nœuds que la taille des entre-nœuds affectent la croissance en hauteur de la plante. Par ailleurs, *B. officinalis* et *Echium* spp. sont des plantes en rosettes, il n'y a donc pas de croissance en hauteur durant la phase végétative et la croissance en hauteur démarre lors de la transition florale avec le développement de la hampe florale (Klemow *et al.* 2002; Gupta and Singh 2010; Asadi-Samani *et al.* 2014). Notons que la croissance de la hampe florale de *E. vulgare* n'a pas été affectée par les stress ; nous émettons l'hypothèse que l'espèce étant bisannuelle, elle mobilise les ressources nutritives accumulées au niveau des racines durant la première année de croissance végétative pour permettre la croissance de la hampe florale.

En affectant la production de feuilles et l'architecture de la plante, la hausse de température et le stress hydrique vont modifier les surfaces photosynthétisantes de la plante. En effet, la sénescence foliaire, bien que partiellement compensée par l'initiation de nouvelles feuilles chez les espèces annuelles, amène une baisse de la production photosynthétique globale, puisque les feuilles sont les principaux organes où se déroule la photosynthèse (Osakabe *et al.* 2014; Taiz *et al.* 2015). Cependant, cette sénescence touchait des feuilles matures. Or, les capacités photosynthétiques atteignent leur maximum une fois les feuilles complètement développées et ensuite diminuent avec l'âge de la feuille (Pearce *et al.* 1968). Les feuilles plus âgées ont dès lors des capacités photosynthétiques inférieures comparées aux feuilles nouvellement développées. La diminution de la surface foliaire se répercute *in fine* sur la production de carbohydrates (Rivero *et al.* 2007; Fahad *et al.* 2017).

2.2. Réponses contrastées des capacités photosynthétiques

Bien que n'ayant pas réalisé de mesures directes de l'intensité du stress, par exemple via le potentiel hydrique pour le stress hydrique, ou via la température foliaire pour le stress thermique, nous avons des mesures de paramètres qui estiment les conséquences des stress sur les processus physiologiques, comme par exemple sur la photosynthèse. Le fonctionnement de la phase photochimique de la photosynthèse (phase claire) a été estimé à travers la teneur en chlorophylle des feuilles ainsi que les mesures liées à l'émission de fluorescence des photosystèmes. Les mesures de conductance stomatique, de taux de photosynthèse et de transpiration nette nous informent sur l'ouverture des stomates, les échanges gazeux et donc la rentrée de CO_2 nécessaire à la phase sombre de la photosynthèse (Osakabe *et al.* 2014). Nous avons observé que les paramètres liés à la photosynthèse étaient affectés principalement par la température.

Les espèces étudiées montraient plutôt une réaction similaire au niveau de la phase photochimique de la photosynthèse en réponse à la température : la teneur en chlorophylle et l'efficacité du PSII ont diminué avec la température chez 3 des 4 espèces, à savoir *B. officinalis* et *Echium* spp. Une augmentation du quenching non photochimique (NPQ), qui correspond à une augmentation de la dissipation par la chaleur, a uniquement été observée chez *E. plantagineum*. La température peut affecter négativement la phase photochimique de la photosynthèse via une altération du taux de transport des électrons ou de l'intégrité du PSII (Prasad *et al.* 2008).

Concernant l'impact de la température sur les échanges gazeux, les espèces ont montré des réactions différentes. La conductance stomatique de *B. officinalis* était plus élevée à 27°C qu'aux autres températures et le water use efficiency instantané (WUE_i) a augmenté avec la température. Les stomates sont restés ouverts sous une température élevée, permettant les échanges gazeux. La conductance stomatique de *E. vulgare* était plus élevée à 24°C ; cependant son WUE a diminué légèrement. Les stomates sont aussi restés ouverts chez ces deux espèces en réaction à la hausse de température, maintenant une conductance stomatique élevée, ce qui diffère de la réponse de *E. plantagineum* où la conductance stomatique a diminué légèrement avec l'augmentation de température. Cependant le WUE de *E. plantagineum* a augmenté, surtout à 24°C, ce qui montre qu'elle a pu tolérer aussi cette augmentation de température. L'augmentation du WUE suggère que *B. officinalis* et *E. plantagineum* ont développé des mécanismes pour faire face aux températures élevées et ont limité la perte d'eau sans réduire la photosynthèse. Une augmentation similaire du WUE a été observée chez des plantes adaptées à des températures élevées (Tambussi *et al.* 2007). Cependant, même si la plante a montré une certaine adaptation en augmentant son WUE, nous n'avons pas mesuré l'activité de la Rubisco, la principale enzyme qui intervient dans la phase sombre de la photosynthèse (Taiz *et al.* 2015). Le stress thermique peut en effet inactiver cette enzyme et perturber la phase de carboxylation (Salvucci and Crafts-Brandner 2004; Ashraf and Harris 2013).

La sensibilité des plantes au stress hydrique était également différente suivant les espèces. Alors que la phase photochimique de la photosynthèse n'était pas affectée pour *B. officinalis* et *E. plantagineum*, elle l'est pour les deux autres espèces. En réponse au stress hydrique, la teneur en chlorophylle a diminué chez *E. vulgare* tandis que l'efficacité des photosystèmes a diminué chez *I. glandulifera*. L'altération de l'appareil photosynthétique est un effet majeur de la sécheresse (Farooq *et al.* 2009) qui conduit à une diminution de la photosynthèse. Quant à l'effet du stress hydrique sur la conductance stomatique, de manière surprenante, seule *E. plantagineum* a fermé ses stomates. Les réponses stomatiques varient considérablement entre les espèces végétales (Lawlor and Cornic 2002). La sécheresse n'a pas non plus affecté la conductance stomatique d'autres espèces telles que *Fagopyrum tataricum* dans des conditions expérimentales similaires (Aubert *et al.* 2020). La fermeture des stomates en réponse au stress hydrique est pourtant une réaction observée chez la plupart des plantes, afin de limiter la transpiration et la perte d'eau (Fahad *et al.* 2017; Lamaoui *et al.* 2018; Sehgal *et al.* 2019). En ce qui concerne les taux de photosynthèse et de transpiration, les deux ont diminué chez les *Echium* spp., bien que

pour *E. plantagineum*, le WUE ait augmenté en réponse au stress hydrique tout comme chez *B. officinalis*. Le taux de transpiration a diminué plus fortement que le taux de photosynthèse. Ces deux dernières espèces montrent une certaine adaptation au stress hydrique en augmentant leur WUE ; un WUE élevé est rapporté dans la littérature comme une stratégie pour augmenter l'efficacité de l'utilisation des ressources produites par la photosynthèse chez plusieurs espèces herbacées (Quinet *et al.* 2015; Gray and Brady 2016; Lambrecht *et al.* 2017). Une diminution du taux net de transpiration est une réponse commune au stress hydrique, puisqu'elle permet de limiter les pertes en eau.

A travers l'étude des paramètres végétatifs et physiologiques, nous constatons que la tolérance des espèces par rapport à la température et au stress hydrique était différente. Ainsi, *I. glandulifera* ne semble pratiquement pas impactée par la hausse des températures. Chez *B. officinalis* et *E. plantagineum*, l'effet de la température ne se marquait qu'à 27°C bien qu'elles toléraient bien la température de 24°C, alors qu'*E. vulgare* subissait des effets négatifs de la température dès 24°C. Ceci peut être mis en relation avec les exigences écologiques des espèces. L'espèce *I. glandulifera* tolère une large gamme de températures, bien qu'elle soit affectée par une température de 27°C, étant donné son aire de répartition en Asie, où elle se développe jusqu'à 3000 mètres. Quant aux autres espèces, *E. vulgare* est l'espèce ayant une répartition géographique la plus nordique, comparativement à *E. plantagineum* et *B. officinalis*, originaires du bassin méditerranéen ; ce qui pourrait expliquer que ces deux dernières espèces tolèrent mieux la température de 24°C par rapport à *E. vulgare*. *B. officinalis* et *E. plantagineum* ont montré, en outre, une certaine plasticité face à la hausse de température, en ayant adapté leur photosynthèse et en initiant de nouvelles feuilles, ce qui n'est pas le cas des deux autres espèces. Les températures optimales de croissance sont en effet spécifiques à chaque espèce (Korres *et al.* 2016). Si la plante est soumise à une température qui dépasse cet optimum, une réduction de croissance est observée (Qaderi *et al.* 2012).

Les espèces sont également affectées différemment par le stress hydrique. L'effet marquant pour 3 des 4 espèces, *B. officinalis, E. plantagineum* et *I. glandulifera,* est la sénescence foliaire atypique des feuilles matures. *B. officinalis* compense cette sénescence en initiant de nouveaux rameaux axillaires ; ce que les autres espèces ne parviennent pas à faire. Par contre, le développement végétatif de *E. vulgare* n'a pas été affecté par le stress hydrique. Les capacités photosynthétiques de *B. officinalis* ne sont pratiquement pas affectées par le stress hydrique alors que les phases claire et/ou sombre sont affectées pour les 3 autres espèces. Une nouvelle fois, nous pouvons mettre en relation ces résultats avec les exigences écologiques des espèces. *I. glandulifera* semblait plus impactée par le stress hydrique que par la hausse des températures ; l'espèce se rencontre dans des biotopes humides (fossés, berges de cours d'eau). Ceci explique que les signes de stress hydrique ont été visibles dès que la teneur en eau du sol a été réduite en dessous de 30%, contrairement aux 3 autres espèces, où la teneur en eau du sol a dû être réduite en dessous de 15% pour que les premiers signes de stress hydrique soient visibles. Le biotope de ces 3 espèces, *B. officinalis, E. plantagineum* et *E. vulgare* correspond à des lieux plutôt secs et limono-sablonneux (bord de chemin, zones rudérales) ; en particulier, *E. vulgare* peut se

développer dans des endroits secs, caillouteux. Nous posons comme hypothèse que cette caractéristique écologique explique le fait que son développement végétatif ne soit pas affecté par le stress hydrique. Globalement, *B. officinalis, E. plantagineum* et *E. vulgare* ont des besoins en eau inférieurs à *I. glandulifera.*

3. Développement reproducteur mis à mal par la hausse de température et le stress hydrique

3.1. Réallocation des ressources et limitation vers les organes reproducteurs

Que ce soit via l'effet de la température et/ou du stress hydrique, nous observons des modifications du développement végétatif et des capacités photosynthétiques des feuilles, ce qui réduit *in fine* les ressources produites par la photosynthèse et disponibles pour le développement reproducteur. Cette limitation de ressources est un effet indirect de la hausse de température et du stress hydrique sur le développement reproducteur. Cependant, on a aussi observé des effets directs de la température et du stress hydrique sur la phase reproductrice puisque certains paramètres du développement reproducteur ont été affectés dès 24°C, alors que le développement végétatif et les capacités photosynthétiques ne l'ont pas forcément été. Le développement reproducteur est particulièrement sensible aux contraintes de températures et à la disponibilité en eau (Zinn *et al.* 2010; Snider and Oosterhuis 2011; Hedhly 2011; Prasad *et al.* 2015; Sage *et al.* 2015). Par ailleurs, la combinaison d'une hausse de température et d'un stress hydrique est d'autant plus préjudiciable pour le développement reproducteur car l'avortement des fleurs, des ovaires ou des graines sont des processus irréversibles, tandis que les capacités photosynthétiques peuvent être partiellement rétablies une fois le stress supprimé (Mahalingam and Bregitzer 2019; Cohen *et al.* 2021).

Une diminution de la production de fleurs et un avortement de celles-ci sont souvent observés en réponse aux stress (Fábián *et al.* 2019; Amuji *et al.* 2020) et la plupart des études expliquent cette diminution de la production de fleurs par la compétition entre organes sources et puits pour la répartition des assimilats (Lawlor and Cornic 2002; Awasthi *et al.* 2014; Feller 2016). Jusqu'à 80% des carbohydrates produits par la photosynthèse peuvent être exportés vers des organes puits, comme les fleurs (Lemoine *et al.* 2013). Nous avons observé chez les 4 espèces, une diminution du nombre de fleurs produites en réponse au stress hydrique. Chez *B. officinalis* et chez *I. glandulifera*, nous avons aussi constaté des avortements floraux. Par ailleurs, le contenu en sucres du nectar a diminué aussi pour 3 espèces sur 4, *B. officinalis, E. plantagineum* et *I. glanduliera.* Les nectaires stockent de grandes quantités de carbohydrates, sous forme d'amidon, avant l'anthèse ; cet amidon est ensuite transformé en saccharose au moment de l'anthèse pour la sécrétion de nectar (Roy *et al.* 2017; Borghi *et al.* 2019). Une diminution de la production de carbohydrates via la photosynthèse peut donc se répercuter sur la teneur en sucres du nectar. Chez *I. glandulifera,* nous avons observé que les teneurs en sucres solubles totaux

étaient supérieures dans les feuilles à 27°C comparativement aux autres températures sans que la phase reproductive ne soit spécifiquement stimulée à cette température. Cette information nous montre que même si les sucres sont bien présents, ils ne sont pas nécessairement disponibles pour le développement reproducteur. En effet, une partie des assimilats peut être utilisée à la mise en place de mécanismes de réponses au stress au détriment de la croissance reproductive (Saddhe *et al.* 2021). Il est montré que les stress abiotiques peuvent d'une part, modifier l'export des carbohydrates du phloème vers les organes floraux (Sevanto 2014) et d'autre part, modifier l'équilibre entre les organes sources et puits (Lemoine *et al.* 2013). La plante peut être considérée comme une série de sources et de puits avec une capacité globale de fixation du carbone et plusieurs puits sont alors "en compétition" pour les assimilats disponibles (Lemoine et al., 2013). En cas de stress abiotiques, la priorité d'allocation vers ces différents puits est revue ; par exemple, dans notre cas, le développement de rameaux axillaires était prioritaire sur le développement reproducteur chez *B. officinalis*. On a observé que la longueur des pétales et la teneur en sucre du nectar étaient négativement corrélées avec le développement des ramifications chez *B. officinalis*, traduisant une compétition possible entre le développement végétatif et reproducteur dans le contexte d'un stress abiotique. Même si nous ne l'avons pas directement observé dans cette thèse, le développement racinaire peut aussi devenir prioritaire sur la croissance aérienne en cas de stress hydrique. Les plantes étendent leur système racinaire pour augmenter la capture d'eau (Chaves *et al.* 2002; Pinheiro and Chaves 2011; Kooyers 2015). La réduction du développement reproducteur que nous avons observé pourrait donc être en partie considérée comme un effet indirect du stress abiotique à travers des modifications de la photosynthèse, de la production d'assimilats et du partage des assimilats entre les organes puits.

Cependant, nous avons observé que la phase reproductive était souvent impactée plus rapidement que la phase végétative par les stress. Après une semaine de stress, on a, par exemple, observé chez toutes les espèces, une réduction de la taille des fleurs et une diminution de la quantité de nectar. Ceci suggère également l'existence d'effets directs des contraintes environnementales sur la phase reproductive car la croissance végétative et la photosynthèse n'étaient pas affectées à ce stade. Les voies métaboliques associées au développement des organes floraux sont particulièrement sensibles à une hausse de température et un stress hydrique (Borghi *et al.* 2019). Néanmoins, dès le moment où on observe une atteinte du développement végétatif ou des capacités photsynthétiques, il est difficile de distinguer les effets indirects d'une limitation de ressources photosynthétiques, par rapport à des effets opérant sur les organes floraux directement.

3.2. Modification des signaux visuels

Le stress hydrique a diminué le nombre de fleurs produites pour les 4 espèces étudiées d'environ 50%. De nombreuses études s'accordent sur la diminution du nombre de fleurs en condition de stress hydrique (Kay and Picklum 2013; Suni *et al.* 2020; Descamps *et al.* 2021 ; mais voir Gallagher and Campbell 2017). Par contre, l'espèce pérenne *Mertensia ciliata* a maintenu sa floraison sous stress hydrique ; cette espèce utilise les ressources

stockées au niveau racinaire pour développer sa floraison printanière (Gallagher and Campbell 2017). Par conséquent, les effets du stress hydrique ne se font sentir qu'après plusieurs années consécutives de sécheresse (Gallagher and Campbell 2017). Dans notre étude, l'espèce la moins impactée était *E. vulgare,* la seule espèce bisannuelle testée ; la réduction de fleurs ne se marquait que pour l'ensemble des fleurs produites et non pour le nombre de fleurs en anthèse.

Le stress hydrique peut entrainer l'avortement de boutons floraux ou diminuer la quantité de bourgeons floraux (Morrison and Stewart 2002; Fang *et al.* 2010; Guo *et al.* 2013; Muhl *et al.* 2014). Des avortements de boutons floraux ont été observés chez deux des plantes étudiées, *B. officinalis* et *I. glandulifera* ; mais n'ont pas pu être suivis chez *Echium* spp. Ces avortements sont décrits aussi comme une réponse courante aux stress abiotiques (Prasad *et al.* 2008; Vile *et al.* 2012). Cette diminution du nombre de fleurs a des conséquences à la fois pour les plantes en limitant leur capacité de formation de graines et pour les pollinisateurs en limitant la quantité de ressources florales disponibles. Une explication d'une production moindre de fleurs en condition de stress hydrique est la possible ré-allocation des carbohydrates vers d'autres organes puits comme par exemple les racines et/ ou dans des mécanismes de résistance aux stress, au détriment des organes reproducteurs (Ghanem *et al.* 2009; Ji *et al.* 2010; Ruan *et al.* 2012; Lemoine *et al.* 2013). Il est en effet connu qu'en réponse au stress hydrique, la plante favorise sa croissance racinaire au détriment de sa croissance aérienne (Sharp *et al.* 2004). Le développement correct des organes reproducteurs repose sur l'importation des carbohydrates produits au niveau des feuilles, via le phloème (Liu *et al.* 2013). Or, comme mentionné plus haut, les stress abiotiques peuvent perturber cette capacité à importer des carbohydrates (Farooq *et al.* 2009; Sevanto 2014).

La température peut également entrainer une réduction du nombre de fleurs (Morrison and Stewart 2002; Liu *et al.* 2012; Takkis *et al.* 2018) même si nous n'avons pas observé cela dans notre étude. Au contraire, la température a plutôt augmenté le rythme d'initiation de nouvelles fleurs chez *E. plantagineum*, résultant en un nombre total de fleurs plus élevé après 5 semaines à 27°C qu'aux autres températures. Nous posons l'hypothèse que les plantes ont accéléré leur développement, pour échapper aux contraintes induites par les stress abiotiques. Après 5 semaines, les plantes à 27°C étaient en fin de floraison (le nombre de fleurs ouvertes par plante etait en nette diminution par rapport aux semaines précédentes), comparées aux plantes à 21°C qui étaient encore en pleine floraison (le nombre de fleurs ouvertes par plante etait en augmentation par rapport aux semaines précédentes). Le pic de floraison était également avancé d'une semaine chez *B. officinalis* à 24°C et 27°C, comparativement à 21°C. Afin de vérifier l'effet de la température sur la durée de floraison et sur le nombre total de fleurs produites, il aurait été intéressant de continuer l'expérience au delà de 6 semaines.

Aussi bien les hausses de température que le stress hydrique ont eu une influence sur la taille des fleurs lors de notre étude ; que ce soit pour la longueur des pétales, la profondeur ou le diamètre des corolles tubulaires pour les 4 espèces. Les modifications de taille

étaient particulièrement conséquentes pour les espèces annuelles ; par exemple, entre 21WW et 27WS, les fleurs d'*E. plantagineum* étaient en moyenne 5 fois plus petites et la surface des corolles était réduite de 70%. Les réductions de taille de fleurs sont observées aussi dans une majorité d'études en réponse au stress hydrique (Descamps *et al.* 2021), que ce soit en conditions contrôlées ou *in natura*. Carroll *et al.* (2001) ont observé une réduction de 33 % de la taille des fleurs après 12 jours de sécheresse pour *Epilobium angustifolium*, et Lambrecht *et al.* (2017) ont signalé une diminution de 10% de la taille des fleurs de *Leptosiphon androsaceus* lors d'années sèches. Réduire la taille des fleurs peut être un avantage pour la plante car elle réduit sa perte en eau par transpiration, mais c'est également un désavantage au niveau pollinisation car cela peut réduire son attractivité pour les insectes pollinisateurs et leur visibilité dans le paysage (Galen 1999; De la Barrera and Nobel 2004; Halpern *et al.* 2010). Par ailleurs, cette réduction de taille modifie la forme des corolles, en particulier les corolles tubulaires, et potentiellement l'accessibilité des ressources florales pour les insectes pollinisateurs.

3.3. Influences sur les quantités et les compositions des ressources florales

3.3.1. Diminution marquée de la quantité de nectar et modification de la composition en acides aminés

Le contenu en nectar des plantes a été fortement réduit par les hausses de température et le stress hydrique, aussi bien le volume que la quantité de sucres par fleur ont diminué chez les espèces annuelles (*B. officinalis*, *E. plantagineum* et *I. glandulifera*). D'autres études ont montré des résultats similaires. Chez *Epilobium angustifolium*, Carroll *et al.* (2001) ont observé une réduction de 60% du volume de nectar après 12 jours de sécheresse. Mu *et al.* (2015) ont montré une réduction de 60 % du volume de nectar pour *Saussurea nigrescens* après un réchauffement expérimental (maximum + 3°C par rapport à la température moyenne annuelle).

La production de nectar de *E. vulgare* n'a pas été affectée par les stress dans notre étude. Phillips *et al.* (2018) ont observé des résultats similaires pour *Lathyrus pratensis*, *Onobrychis viciifolia*, et *Prunella vulgaris*, dans des pelouses calcaires et ont attribué le maintien des récompenses en nectar à la résistance au stress hydrique pour ces espèces dans ce type de biotope. Les bisannuelles ont la possibilité d'allouer toutes leurs ressources au développement végétatif pendant la première année ; pendant la deuxième année, toutes les ressources de la première année peuvent alors être investies dans le développement reproducteur ; ce qui leur donne un avantage par rapport aux espèces annuelles qui doivent assurer leur développement végétatif et reproducteur en une année.

Comme observé chez plusieurs espèces, nous nous attendions à une augmentation de la concentration en sucres dans le nectar en cas de stress hydrique (Halpern *et al.* 2010; Takkis *et al.* 2018); une moindre disponibilité en eau réduisant les possibilités de dilution du nectar. Cet effet du stress hydrique sur la concentration en sucres du nectar a

uniquement été observé chez *E. plantagineum*. Chez les autres espèces, le stress hydrique n'a pas eu d'influence sur la concentration en sucres du nectar. Il a aussi été montré dans d'autres études, que malgré une diminution de volume en réponse au stress hydrique, la concentration en sucres restait inchangée (Carroll *et al.* 2001). La concentration du nectar en sucres semble être plus sensible à la hausse des températures : elle tend à diminuer avec l'élévation des températures chez *E. plantagineum* et *I. glandulifera*, et à augmenter chez *B. officinalis*. Il a été montré qu'en général, la température tend à augmenter la concentration en sucres du nectar jusqu' à une certaine température qui dépend de l'espèce, avant de diminuer. Une corrélation entre la variation de température et la concentration en sucres au sein du nectar a été reportée dans la littérature (Freeman and Head 1990; Jakobsen and Kritjánsson 1994; Petanidou and Smets 1996). La concentration en sucres du nectar dépend aussi directement de l'humidité relative de l'air ambiant : une humidité faible entraîne une évaporation rapide de l'eau du nectar, et donc une concentration en sucres élevée, alors qu'à l'inverse une humidité élevée limite l'évaporation de l'eau du nectar et maintient une concentration en sucres plus faible (Bertsch 1983; Corbet 2003; Pacini and Nepi 2007; Chabert *et al.* 2020). La morphologie florale influence également l'évaporation de l'eau au niveau du nectar : l'évaporation sera plus réduite quand les nectaires se trouvent au fond d'une corolle tubulaire que dans le cas où ils sont exposés directement à la surface d'une corolle plane. Puisque dans nos expériences réalisées en chambre de culture, l'humidité relative du phytotron était maintenue entre 75 et 85%, cela a limité l'évaporation de l'eau contenue dans le nectar. Enfin, la concentration en sucres du nectar tend aussi à augmenter durant l'anthèse comme nous l'avons observé chez *B. officinalis*.

Le stress hydrique a diminué la teneur en saccharose et a favorisé une augmentation des teneurs en fructose et en glucose du nectar, ce qui a modifié le rapport saccharose/hexoses pour *B. officinalis*. Seules quelques études ont examiné l'effet des stress abiotiques sur la composition en sucres du nectar. Rering *et al.* (2020) ont également observé une plus faible proportion de saccharose par rapport à la proportion d'hexoses chez des plantes de *Fagopyrum esculentum* en stress hydrique ; d'autres études n'ont pas montré d'effets (Villarreal and Freeman 1990; Clearwater *et al.* 2018).

Les hausses de température et le stress hydrique ont augmenté la concentration totale d'acides aminés dans le nectar de *B. officinalis*. Il s'agit de la seule espèce dont nous avons étudié le profil en acides aminés. Les acides aminés dans le nectar sont présents en nettement moins grande quantité que dans le pollen (environ 1000 fois moins chez *B. officinalis*), puisque le nectar est avant tout considérée comme la source principale de sucres pour les insectes. Cependant, les acides aminés semblent jouer un rôle dans l'attractivité des insectes également (Heil 2011). Les hausses de température ont aussi eu pour effet de diminuer la proportion des acides aminés essentiels. Avec la température, ce sont principalement les concentrations en alanine, en arginine, en phénylalanine, en proline et en valine qui ont augmenté, ce qui a eu pour conséquence de diminuer la concentration en acides aminés essentiels, bien que le nectar ne soit pas la source principale d'acides aminés essentiels. La composition et la proportion relative de chaque

acide aminé sont décrites comme étant plus constantes contrairement à la concentration totale qui varie plus facilement (Gardener et Michener 2001). Or, cette étude a permis de mettre en évidence que des facteurs abiotiques peuvent aussi avoir une influence sur cette composition et sur les proportions relatives. En particulier, nous avons observé une augmentation de proline (jusqu'à 800%) dans le nectar en réponse à la hausse de température et du stress hydrique. La proline joue de nombreux rôles dans la réponse aux stress abiotiques (entre autres, dans la protection des structures cellulaires lors de déshydratation, Ashraf and Foolad 2007; Lehmann *et al.* 2010) et est aussi utilisée par les insectes qui peuvent spécifiquement la dégrader et l'utiliser comme énergie pour leur activité de vol (Carter *et al.* 2006; Teulier *et al.* 2016).

3.3.2. Diminution de la quantité de pollen et influence sur la teneur en polypeptides

En ce qui concerne le nombre de grains de pollen par fleur, les résultats variaient selon les espèces. Tandis que ce nombre restait inchangé chez *B. officinalis*, il a diminué en réponse à la hausse de température et/ou du stress hydrique chez *E. vulgare* et *I. glandulifera*. Par contre, pour *B. officinalis*, nous avons mesuré le poids de pollen produit par fleur et celui-ci a diminué de moitié avec la hausse de température. Bien que difficilement quantifiables, nous avons observé chez les 4 espèces des modifications de la morphologie des grains de pollen en réponse aux stress ; chez *B. officinalis*, à 27°C, de nombreux grains de pollen étaient plus petits et « déformés », ce qui peut expliquer le poids plus faible observé. Enfin, en particulier chez *I. glandulifera*, de nombreuses anthères étaient vides à 27°C. Il est décrit par ailleurs que l'augmentation de la température et le stress hydrique appliqués pendant la morphogenèse de la fleur affectent particulièrement le développement du pollen (Porch and Jahn 2001; Barnabás *et al.* 2008; Zinn *et al.* 2010; Snider and Oosterhuis 2011; Hedhly 2011; Paupière *et al.* 2017). Sato *et al.* (2006) ont observé qu'en cas d'augmentation modérée de la température (+ 4°C), la production de pollen de *Solanum lycopersicum* n'était pas affectée même si la viabilité du pollen était réduite (20 % par rapport à 85 % pour les plantes témoins). Dans une étude réalisée dans des conditions expérimentales similaires aux nôtres (21°C vs 27°C), Aubert *et al.* (2020) ont également observé des résultats différents selon l'espèce: tandis que la production de pollen a augmenté avec la température chez *F. esculentum*, elle a diminué chez *F. tataricum*. Sous stress hydrique, Su *et al.* (2013) ont également observé un développement anormal des anthères et une faible viabilité du pollen. Des études récentes sur *Fagopyrum esculentum* ont montré des résultats différents concernant l'impact du stress hydrique ; alors que Rering *et al.* (2020) n'ont pas observé d'effet de stress hydrique, Aubert *et al.* (2020) ont montré une diminution d'un peu plus de 10%. Le nombre de grains de pollen est déterminé très tôt au cours de la morphogenèse florale (Goldberg, 1993), et la micro-sporogenèse est la phase la plus sensible aux stress abiotique (Sage *et al.* 2015; Gray and Brady 2016; Yu *et al.* 2019; Borghi *et al.* 2019). L'augmentation de la température peut aussi réduire la concentration d'amidon dans les grains de pollen en développement, provoquant des échecs dans leur développement (Pressman *et al.* 2002; Sato *et al.* 2006). Cette diminution de quantité de pollen peut aussi être mise en lien avec les processus de

réallocation des ressources entre organes puits qui surviennent lors de stress abiotiques (Lemoine *et al.* 2013) ; les fleurs par exemple, entrent en compétition avec la croissance racinaires ou le développement de rameaux axillaires (Chaves *et al.* 2002; Kooyers 2015).

La composition du pollen, son contenu protéique et en acides aminés, sont affectés par les stress abiotiques. En ce qui concerne l'influence de la température sur le contenu en polypeptides (protéines > 10 000 Da), nous avons obtenu des résultats contrastés entre les deux espèces chez qui nous avons fait les mesures ; alors que cette concentration a diminué avec la hausse de température chez *I. glandulifera*, elle a augmenté chez *B. officinalis*. À notre connaissance, une seule autre étude récente a étudié l'effet de températures plus élevées sur la qualité du pollen mais n'a pas révélé de diminution de la concentration en protéines (Russo et al. 2020). Cependant, l'augmentation de température n'était que de +0.5°C par rapport à la température contrôle. Néanmoins, bien que la concentration en protéines ait augmenté dans le pollen de *B. officinalis* avec l'augmentation de la température, cette augmentation a été atténuée par la diminution de la production de pollen. Si nous extrapolons la quantité de protéines que le pollinisateur peut potentiellement butiner en visitant une fleur, elle reste constante entre les traitements (18,6 µg/fleur à 21WW contre 18,8 µg/fleur à 27WS).

A la différence du nectar, la concentration totale en acides aminés ainsi que la proportion d'acides aminés essentiels n'ont pas été affectées par la hausse de température et le stress hydrique. Le pollen est avant tout le gamétophyte mâle et a un rôle crucial pour la reproduction des plantes avant d'être une ressource florale consommé par les insectes (Rering *et al.* 2020). Cette différence peut expliquer que la composition du pollen soit plus stable que celle du nectar et moins plastique aux conditions environnementales. Même si la concentration en acides aminés totale n'a pas été influencée par les stress, on constate tout de même des variations au niveau des proportions relatives des acides aminés ; 7 acides aminés ont diminué légèrement en proportion relative par rapport à 21WW (alanine, aspargine, glutamine, isoleucine, leucine, phenylalanine, serine) par rapport à la proline et l'hydroxyproline qui ont augmenté notablement (+ de 200% à 27WS). Il est difficile à ce stade de tirer des conclusions sur l'impact de la variation en composition des acides aminés au sein du pollen sur la qualité nutritive de celui-ci.

4. Modification du comportement des insectes pollinisateurs et conséquences potentielles sur les interactions plantes-pollinisateurs

4.1. Diminution des visites sur les fleurs de plantes stressées

Pour observer les modifications du comportement de visite, nous avons uniquement travaillé avec *B. officinalis*. A la fois dans l'expérience en extérieur et celle en chambre de vol, les bourdons ont significativement visité moins les fleurs de plantes stressées,

comparativement aux fleurs des plantes contrôles (21WW). Dans l'expérience en extérieur, nous avons présenté des plantes issues des 3 températures et des 2 régimes hydriques ; les plantes provenant de 21WW ont reçu en moyenne 5 visites par heure par plante, contre moins de 3 visites par heure par plante pour les autres traitements. Dans l'expérience en chambre de vol, nous avons présenté uniquement deux traitements différents, des plantes cultivées à 21°C et d'autres à 26°C et travaillé avec des bourdons naïfs provenant de ruchettes commerciales (*Bombus terrestris,* Biobest). Sur base de l'analyse des séquences de vols, ces bourdons ont montré une constance de visite pour les fleurs des plantes cultivées à 21°C, ils ont visité 4 fois plus de fleurs des plantes cultivées à 21°C par rapport aux fleurs des plantes cultivées à 26°C. En outre, leur 1ère visite était réalisée dans plus de 80% des cas sur une fleur d'une plante cultivée à 21°C. Grâce à ces expériences, nous avons révélé que la hausse de température et le stress hydrique provoquent des modifications de traits floraux et de récompenses florales que les bourdons sont capables de détecter et qu'ils adaptent leur séquence de vol en conséquence.

Nous avons pu montrer que la modification de traits floraux explique en partie ces modifications de comportement. L'expérience en chambre de vol a révélé que la densité florale impacte le choix de visite : moins la plante a de fleurs et plus elles sont petites, moins elle a de chance d'être visitée. La taille des fleurs est largement réduite par la hausse de température et le stress hydrique. Cela peut altérer le choix du pollinisateur à visiter la fleur (Chittka *et al.* 1999). Réduire la taille des fleurs a des conséquences sur les taux de visite des pollinisateurs et sur les différents insectes pollinisateurs visitant la fleur (Stanton and Preston 1988; Gómez *et al.* 2008, 2020). Même si nous n'avons pas pu faire d'observation sur *Echium* spp., les réductions de la taille de fleurs sont telles qu'un mismatch morphologique entre la fleur et les pollinisateurs est envisageable. Cela a d'ailleurs été mis en avant par Gérard *et al.* (2020) comme un mismatch potentiel dû au réchauffement climatique. Les espèces de bourdons à longue langue (> 10 mm de long) (par exemple, *Bombus pascuorum* et *B. hortorum*) sont parmi les principaux pollinisateurs des *Echium* spp. (S. Marée, 2018). La profondeur de la corolle des fleurs d'*E. plantagineum* est inférieure à 10 mm à 27°C alors qu'elle est supérieur à 30 mm à 21°C. La réduction de la taille des corolles et de la profondeur des tubes pourrait modifier l'efficacité de la pollinisation (Miller-Struttmann et al. 2015). Suivant la morphologie de la fleur, l'impact de la réduction de la taille de la fleur ne sera probablement pas le même sur l'efficacité de la pollinisation; les fleurs à corolle tubulaire seront plus impactées par un mismatch morphologique que les fleurs à corolle plane. En effet, les insectes doivent généralement s'insérer dans la corolle tubulaire pour récolter des ressources florales (et par la même occasion polliniser les fleurs), à la différence des corolles planes où les ressources florales sont directement accessibles. Cependant, parallèllement à cette diminution de la taille des fleurs, nous pourrions aussi observer une diminution de la taille du corps des insectes, comme les hausses de température (supérieur à 33°C) diminuent aussi la taille des corps des bourdons d'après une étude de Gerard *et al.* (2018).

L'expérience en chambre de vol nous a permis de suivre de plus près le comportement de butinage. Malgré des ressources florales présentes en moindre quantité dans les fleurs des plantes cultivées à 26°C, nous n'avons pas noté de modification du comportement en terme de prélèvement de ressources (nectar et/ou pollen) ou du temps passé par fleur. Deux hypothèses peuvent être énoncées pour expliquer cette observation. Premièrement, dans le cas de cette expérience, nous avons travaillé avec *Bombus terrestris*, qui est une abeille à langue courte, généraliste et qui possède une plasticité comportementale élevée (Goulson 2010). Deuxièmement, la bourrache possède des nectaires facilement accessibles, à la base des pétales ; même avec une réduction de la taille de la corolle, cela n'impacte pas l'accessibilité des nectaires. Les résultats auraient peut-être été différents si nous avions travaillé avec une fleur à corolle profonde (telle que les fleurs d'*Echium* spp.) et une abeille à longue langue. Les modifications de morphologie florale se répercuteraient alors potentiellement sur le temps de manipulation de l'insecte pour accéder aux nectaires.

L'expérience en extérieur a révélé que les taux de visites moyen par plante étaient corrélés avec la production moyenne de nectar. Les abeilles préfèrent en effet butiner les fleurs qui produisent plus de nectar (Chittka *et al.* 1997; Blarer *et al.* 2002; Cartar 2004; Dreisig 2012). Même si nous avons eu dans cette expérience une légère hausse de la concentration du nectar (passant de 50% à 21, 24°C à 60% à 27°C) ; celle-ci n'a pas été limitante pour la succion des insectes, les insectes à langue longue préférant les nectars un peu plus dilué (30-50%) par rapport à ceux à langue courte (40-60%) (Borrell 2005; Nicolson and Thornburg 2007; Pyke 2016). Noter l'espèce de bourdons visitant les fleurs aurait été intéressant pour savoir si les espèces à langues courtes/longues visitaient de manière équivalente les fleurs des plantes des différents traitements. Bien que l'expérience en chambre de vol n'ait pas permis de révéler une influence des récompenses florales sur le comportement des pollinisateurs, il est montré, en plus du nectar, que la quantité et la composition du pollen peuvent aussi modifier le comportement de visite (Cook *et al.* 2003; Vanderplanck *et al.* 2014; Somme *et al.* 2014; Muth *et al.* 2016).

L'attractivité des plantes est un phénomène complexe dans lequel plusieurs signaux convergent et interagissent ; tandis que le nectar et le pollen servent de récompenses pour les pollinisateurs, la taille, la forme, l'odeur et la couleur d'une fleur sont les signaux d'annonce (Chittka et al. 1997; Gumbert 2000; Raguso 2004; Leonard et al. 2011). Par ailleurs, les choix de visite résultent d'interactions entre la préférence innée, la constance, la diversité du choix proposé , le coût de la recherche et les informations sociales, et chacune de ces composantes interagit les unes avec les autres (Leadbeater and Chittka 2007; Austin et al. 2019; Latty and Trueblood 2020).

Aussi bien dans l'expérience en extérieur que dans celle en chambre de vol, nous avons décidé de travailler avec des plantes dont les traits et les récompenses florales étaient modifiées, ce qui constitue une situation plus réaliste qu'une expérience où nous aurions fait varier un seul signal. Cependant, il est probable que d'autres signaux aient aussi été modifiés, en particulier les odeurs, que nous n'avons pas quantifiées ni analysées.

Notre objectif de départ était bien de voir si en réponse aux modifications de traits floraux et récompenses florales, les pollinisateurs adapteraient leur schéma de vol ; nos expériences nous ont permis de répondre positivement à cette question. Approfondir les expériences comportementales en ne mettant à disposition qu'un seul traitement à la fois permettrait de mesurer plus précisément les quantités de ressources florales collectées et d'amener des résultats complémentaires à notre étude.

4.2. Impact sur les populations d'insectes pollinisateurs via une limitation de la quantité de ressources

La diminution du nombre de fleurs et des récompenses florales dues à la hausse de température et au stress hydrique peut diminuer la quantité de nourriture pour les pollinisateurs et donc affecter les populations de pollinisateurs (Miller-Struttmann et al., 2015 ; Baude et al., 2016). Pour *B. officinalis*, entre 21WW et 27WS (soit le traitement le plus stressant), en moyenne, nous avons observé une diminution de 50% du nombre de fleurs, de 50% de la quantité de pollen et de plus de 80% de la quantité de nectar par fleur. Les diminutions sont encore plus importantes pour *I. glandulifera* et *E. plantgineum.* Par contre, *E. vulgare* a montré une certaine tolérance au stress, puisque ni le nombre de fleurs ni la sécrétion de nectar n'ont été affectés.

Ces diminutions de ressources florales par fleur augmentent le coût de visite pour les pollinisateurs, puisqu'ils doivent visiter plus de fleurs pour collecter la même quantité de ressources. Les besoins des pollinisateurs en terme de quantité de ressources sont étudiés principalement pour les abeilles sociales, *Apis mellifera* et *Bombus* spp. Chaque individu d'*Apis mellifera a* besoin en moyenne de 4 mg de sucres et de 3,4 à 4,3 mg de pollen chaque jour pour survivre et a besoin de 59,4 mg de sucres et de 25 à 37,5 mg de pollen pour qu'une larve puisse atteindre l'âge adulte (Rortais *et al.* 2005; Hrassnigg and Crailsheim 2005; Brodschneider and Crailsheim 2010). Chez les abeilles sociales, la nutrition se régule à l'échelle individuelle mais aussi à l'échelle de la colonie. Les abeilles domestiques sont ainsi capables de stocker une grande quantité de ressources, ce qui est moins le cas des bourdons, rendant ces derniers plus sujets à des déficits de nourriture. Par ailleurs, les colonies de *Bombus* spp. ont des besoins nutritionnels différents suivant les espèces : *Bombus terrestris* est l'espèce la plus performante (en terme de g de pollen par g de larve produite) et nécessite deux fois moins de pollen et six fois moins de nectar pour produire la même masse de larves que *B. hypnorum* (Moerman *et al.* 2016; Rotheray *et al.* 2017). Les besoins nutritionnels des abeilles sauvages nécessitent d'être investiguées car peu d'études s'y sont intéressées jusqu'ici (Woodard and Jha 2017; Lawson *et al.* 2021).

Le nectar a un rôle très important dans la nutrition, puisque le ratio entre la consommation de protéines (pollen) *versus* sucres (nectar) est de 1 g de protéines pour ~43 g de sucres pour *Bombus terrestris* (Rotheray *et al.* 2017). Or c'est pour le nectar qu'on constate le plus de diminution en réponse à une hausse de température ou un stress hydrique. Par ailleurs, il est montré que les ressources sont particulièrement importantes

pour l'établissement des colonies au début du printemps (Rotheray *et al.* 2017). Les sécheresses connues durant le printemps ces dernières années sont donc particulièrement dommageables pour les abeilles sociales et probablement d'autres abeilles sauvages. Enfin, cette diminution de ressources à l'échelle du paysage peut augmenter les phénomènes de compétitions entre les abeilles domestiques et les abeilles sauvages (Goulson *et al.* 2015; Thomson 2016). Il existe déjà, à ce jour, des périodes durant le printemps et l'été où la disponibilité en ressources florales est moindre, en particulier en juin et durant la fin de l'été (Balfour *et al.* 2018; Requier *et al.* 2019; Simanonok *et al.* 2020)

Par ailleurs, en plus d'une réduction en nombre de fleurs et en ressources florales, nous avons montré que la durée d'anthèse des fleurs chez *I. glandulifera* est réduite avec la hausse des températures, passant de plus de 5 jours à 21°C à environ 3 jours à 27°C. Cette hausse de température semble aussi influencer la durée de floraison des espèces annuelles, comme nous l'avons observé chez *E. plantagineum* et *B. officinalis*. Des températures plus hautes ont accéléré la floraison. Une durée d'anthèse plus courte ainsi qu'une fenêtre temporelle de floraison raccourcie accentuent encore la réduction de disponibilité de ressources florales. Les hausses de température peuvent aussi retarder le début de la floraison comme cela a été montré chez deux espèces de *Fagopyrum* spp. (Aubert *et al.* 2020). Cette disponibilité en ressources florales est un facteur limitant majeur pour la survie des insectes pollinisateurs (Goulson *et al.* 2015; Carvell *et al.* 2017). En particulier, cette réduction de la fenêtre temporelle de récolte pourrait poser problème aux insectes spécialistes qui verraient leur période de collecte raccourcie. Une manière de diminuer cette pression de récolte serait d'augmenter la taille des populations de plantes, indispensables à ces insectes spécialistes.

4.3. Impact sur les populations d'insectes pollinisateurs via une modification de la composition des ressources florales

Les études sur la composition des ressources florales et l'influences des conditions abiotiques sur celle-ci sont toujours assez rares. Or, la composition nutritionnelle des ressources, telles que la composition en sucres du nectar, les teneur en acides aminés et en polypeptides du pollen, est un paramètre crucial pour la survie des abeilles, comme le montrent des études expérimentales où une qualité inférieure (par exemple, réduction de la teneur en protéines ou en acides aminés) des ressources florales a été associée à une diminution de la longévité ou de la capacité de reproduction des abeilles (Hoover *et al.* 2012; Vaudo *et al.* 2015; Ziska *et al.* 2016).

L'impact de la hausse de température et du stress hydrique sur la composition des ressources florales étudié dans cette thèse a montré des résultats parfois opposés. Pour la composition en sucres du nectar, nous avons montré que le stress hydrique augmente la proportion d'hexoses par rapport au saccharose chez *B. officinalis*. Du point de vue de la nutrition des insectes, cela ne semble pas les affecter puisque ces 3 sucres principaux (glucose, fructose et saccharose) sont facilement métabolisés (Huber and Mathison 1976). Concernant la composition du pollen, nous avons mesuré la teneur en

polypeptides chez *I. glandulifera* et chez *B. officinalis* ; la température a diminué la teneur en polypeptides chez la première, alors qu'elle l'a augmenté chez la seconde. Il est difficile à ce stade de tirer une conclusion sur l'impact nutritif pour les abeilles bien qu'il soit montré, qu'au-delà de la teneur en polypeptides, les abeilles sont aussi sensibles au contenu total en acides aminés (Somme *et al.* 2014; Moerman *et al.* 2015). La teneur en acides aminés du pollen de *Borago* est restée supérieure à 250 mg/g de pollen et n'a pas été affectée par la hausse de température ou le stress hydrique. Une teneur en acides aminés d'environ 200 mg/g de pollen permet le bon développement des colonies de *Bombus terrestris* (Génissel *et al.* 2002; Moerman *et al.* 2015; Ruedenauer *et al.* 2019). Le pollen de *B. officinalis* reste dès lors une ressource nutritive correcte, malgré les stress. Cependant, nous avons constaté des modifications dans la proportion des différents acides aminés suite à la hausse de température et au stress hydrique, aussi bien dans le nectar que dans le pollen. Nous avons pu observer que la proline était en nette augmentation, aussi bien dans le nectar que dans le pollen (bien que la quantité d'acides aminés soit nettement inférieure dans le nectar par rapport au pollen, environ 1000 fois moins). Entre 21WW et 27WS, le pourcentage de proline est passée de 22 à 40% dans le nectar, et de 8 à 16% dans le pollen (jusqu'à 25% à 24WS). Pour les insectes, la proline est très attractive. Elle est nécessaire à la ponte des œufs par la reine chez *Apis mellifera* (Hrassnigg, Leonhard, et Crailsheim 2003), elle est également utilisée comme source d'énergie pour la phase initiale du vol (Carter et al. 2006 ; Teulier et al. 2016). Les insectes montrent d'ailleurs une préférence pour les nectars contenant de la proline (Alm et al. 1990 ; Bertazzini et al. 2010). Aucun autre acide aminé ne peut, en effet, être métabolisé aussi rapidement que la proline et libérer autant d'ATP sans être complètement métabolisé (Carter et al. 2006). D'autres acides aminés varient en proportion, la proportion d'acides aminés essentiels est affecté par la hausse des températures pour le nectar, mais pas pour le pollen. Un acide aminé essentiel est un acide aminé qui ne peut être produit *de novo* par le métabolisme de l'insecte (c'est-à-dire l'arginine, l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine, selon de Groot, 1953). Lorsqu'un AAE manque dans l'alimentation, ou lorsqu'il est présent en quantité insuffisante, il y aura un manque de cet acide aminé lors de la synthèse des protéines (Mariotti 2017). La composition des ressources florales en acides aminés est, jusqu'à présent, estimée surtout en fonction des teneurs totales et de la proportion des acides aminés établie par de Groot (1953) sur *Apis mellifera* et certains études concernant plusieurs espèces *Bombus* spp. (Brodschneider and Crailsheim 2010; Moerman *et al.* 2017). Cependant, les exigences nutritionnelles des abeilles sauvages demeurent à ce jour pratiquement inconnues (Woodard and Jha 2017; Nikkeshi *et al.* 2021). D'autres études sur les besoins nutritifs précis en termes d'acides aminés sont nécessaires afin de pouvoir mieux cerner l'impact de la variation relative des différents acides aminés au niveau des ressources florales.

4.4. Impact des hausses de température et sécheresses sur les interactions plantes-pollinisateurs

Enfin pour terminer, dans un contexte de changements climatiques, les plantes ne sont pas les seules à subir les effets de conditions environnementales plus contraignantes, les insectes aussi subissent directement ces conditions de manière directe ou indirecte et doivent s'y adapter. Il a été montré récemment qu'avoir accès à des ressources de bonne qualité nutritionnelle permet de mitiger l'impact négatif des hausses de température sur les bourdons (Vanderplanck et al. 2019). Ce point renforce la nécessité de mener des recherches pour savoir quelles sont les espèces végétales qui tolèrent le mieux ces hausses de température et ces conditions de sécheresse afin de pouvoir maintenir une production de ressources florales en quantité et en qualité au niveau du paysage tout au long de la saison pour les pollinisateurs.

Au vu des contraintes engendrées par les changements environnementaux (les hausses de température et les sécheresses ne constituent pas les seules contraintes pour les écosystèmes, voir point 5 sur les limites de l'étude), les réseaux d'interaction entre plantes et pollinisateurs vont être impactés par ces changements (Fisogni *et al.* 2021; Simon *et al.* 2021). D'une part au niveau des pollinisateurs, les insectes sociaux, de par leur fonctionnement en colonie, peuvent être favorisés comparativement aux insectes solitaires. Les abeilles qui développent des colonies de taille importante ont généralement des distances de vol supérieures, des périodes de vol plus longues et des capacités de régulation de collecte de ressources florales supérieures aux abeilles solitaires (Willmer 2011). Les insectes généralistes, qui à l'opposé des insectes spécialistes, ne dépendent pas d'une seule espèce végétale vont pouvoir réorienter leur collecte de ressources florales vers les plantes qui résisteront le mieux aux nouvelles contraintes climatiques. L'expansion de certaines espèces d'insectes généralistes est déjà constatée (Ghisbain *et al.* 2021). D'autre part, les plantes font face à ces nouvelles contraintes et cela induit aussi des modifications au niveau des communautés végétales (Ropars *et al.* 2020) ; par exemple, de nombreuses Asteraceae tolère bien les périodes de déficit hydrique et ont montré une augmentation de leur abondance dans une étude au Canada, ce qui s'est répercuté sur les réseaux d'interactions (Simon *et al.* 2021). Ces contraintes environnementales peuvent aussi favoriser l'expansion d'espèces exotiques suite à leur meilleure résistance à des contraintes environnementales (McAlpine *et al.* 2008). En situation de contraintes environnementales modérées, les réseaux d'interaction pourraient s'orienter vers une généralisation et une homogénisation des communautés de plantes et d'insectes pollinisateurs (Fisogni *et al.* 2021; Vasiliev and Greenwood 2021) ; cependant, la dynamique d'évolution est complexe à prédire au vu des nombreux facteurs qui interviennent dans les réseaux d'interactions plantes-pollinisateurs.

5. Limites de l'étude

5.1. Complexité des changements climatiques

La variation des paramètres environnementaux induite par les changements climatiques est bien plus complexe qu'une « simple » augmentation de température couplée à une modification du régime de précipitation. Les plantes font face également à une augmentation de la teneur en CO_2 , ce qui a pour effet d'augmenter la productivité en particulier pour les plantes en C3, comme c'est le cas pour les espèces modèles étudiées dans cette thèse (Dusenge *et al.* 2019). Cependant, de nombreux autres paramètres peuvent entrer en jeu, comme la disponibilité en eau ou en nutriments qui peuvent finalement limiter la croissance et annuler l'effet « fertilisant » du CO_2 (Hamann *et al.* 2021). En Europe, certains scénarios prévoient également une augmentation de l'irradiance solaire, mais cette tendance n'est pas générale à toutes les régions et il semblerait y avoir beaucoup de variabilité dans les études et les scénarios de modélisation (Ermolli *et al.* 2013; Gil *et al.* 2019). Enfin, en plus des modifications du régime des précipitations, le système Terre subit aussi actuellement un « assèchement atmosphérique » global, résultant d'une augmentation du déficit de pression de vapeur d'eau[6] (VPD), lui-même provoqué, entre autres, par des températures plus élevées. Ce phénomène devrait s'intensifier avec les changements climatiques (Dai 2013; López *et al.* 2021). Cette augmentation globale de VPD est associé à une diminution de la productivité des plantes au niveau mondial (Yuan *et al.* 2019). L'augmentation de VPD résulte au niveau de la plante en une augmentation du flux de transpiration, que la plante peut réguler via l'ouverture de ses stomates. Ce phénomène couplé à un déficit hydrique au niveau du sol accentue la difficulté de régulation des pertes d'eau à l'échelle de la plante. Le système est d'autant plus complexe que des variabilités régionales peuvent affecter les prédictions climatiques (Hamann *et al.* 2021). Enfin, la réaction des écosystèmes sera différente suivant les régions du globe ; à ce jour, il convient de faire aussi attention qu'un biais au niveau des publications existe En effet, la plupart des publications concernent les régions tempérées et polaires, délaissant les espèces et écosystèmes tropicaux qui ont pourtant des réponses spécifiques aux changements climatiques (Sheldon 2019).

5.2. Autres effets sur les interactions plantes-pollinisateurs

Cette thèse a permis de documenter les effets des changements climatiques sur les traits floraux et les ressources florales. Même si le rôle des changements climatiques dans le déclin des pollinisateurs semble jusqu'ici sous-estimé (Vasiliev and Greenwood 2021), un grand nombre d'autres facteurs sont à l'origine de ce déclin et modifient les interactions

[6] Le déficit de pression de vapeur (VPD), qui décrit la différence entre la pression de vapeur d'eau à saturation et la pression de vapeur d'eau réelle pour une température donnée, est un facteur important de la demande en eau atmosphérique pour les plantes (Rawson *et al.* 1977).

plantes-pollinisateurs : notamment l'intensification de l'agriculture, la perte d'habitat et la fragmentation des paysages, la modification de la diversité végétale, les pesticides, la prolifération des agents pathogènes et des espèces exotiques envahissantes (Potts *et al.* 2010). Il n'existe pas à ce jour de consensus quant à l'importance relative de ces différents facteurs de stress dans le déclin des pollinisateurs (Goulson *et al.* 2015). En outre, différents facteurs agissent en synergie, ce qui rend la prise en compte des impacts des différents facteurs encore plus complexe (González-Varo *et al.* 2013). Les activités humaines causent, entre autres, une augmentation de la quantité d'azote disponible dans l'environnement (de Vries 2021). D'une part, à des niveaux supérieurs à 5-10 kg $N.ha^{-1}.an^{-1}$, la diversité des espèces végétales commence à diminuer et à évoluer vers des espèces plus nitrophiles[7] (Roth *et al.* 2013). Cette modification des communautés végétales vers des espèces plus nitrophiles renforce l'idée selon laquelle on tend vers une généralisation des espèces végétales. D'autre part, cette disponibilité en nutriments et en azote en particulier agit aussi sur les traits floraux et notamment les signaux olfactifs comme cela a été montré récemment sur *Arabis alpina* (Luizzi *et al.* 2021).

5.3. Effets des adaptations locales de populations

Dans ce contexte, la dynamique évolutive des interactions plantes-pollinisateurs est compliquée à aborder. Ma thèse s'est concentrée sur l'observation de variations de traits phénotypiques, mais nous n'avons pas étudié l'impact des populations sur la variation de ces traits, ce qui nous aurait permis d'amener une approche plus évolutive pour les espèces modèles de l'étude. Il est important de nuancer les résultats de cette thèse, au vu des résultats de l'étude de Suni *et al.* (2020) par exemple. Ceux-ci ont étudié les réponses au stress hydrique de différentes populations de *Phlox drummondii*, adaptées à des régimes de précipation différents. Ils ont montré qu'il y avait une variation génétique dans la plasticité de plusieurs traits, de sorte que les réponses au stress hydrique variaient suivant l'origine des populations. Par exemple, le volume et la teneur en sucres du nectar des plantes provenant de la région la plus sèche étaient plus élevés dans le traitement en stress hydrique par rapport au traitement contrôle ; contrairement aux plantes provenant de la région la plus humide, où le volume et la teneur en sucres du nectar étaient inférieurs dans le traitement en stress hydrique par rapport au traitement contrôle (Suni *et al.* 2020).

5.4. Contraintes techniques liées aux chambres de culture

Nous devons tenir compte également que les expériences ont été menées en chambres de culture. Ces chambres de culture permettent de contrôler l'environnement biotique et abiotique (conditions « contrôlées »), ce qui donne l'opportunité aux chercheurs de faire varier un seul paramètre pour détecter des effets de la modification d'un paramètre

[7] En effet, dans les systèmes oligotrophes, où l'azote est généralement l'élément limitant la croissance le plus important, une augmentation de la disponibilité de l'azote entraîne une augmentation du nombre d'espèces nitrophiles qui supplantent les espèces adaptées à la carence en azote (de Vries 2021).

spécifique sur la croissance des plantes ; ce qui est très difficile lorsque les expériences sont menées *in natura* où un ensemble de paramètres varient en même temps. Il est alors compliqué d'associer la variation d'un trait spécifique avec un seul facteur environnemental ; alors que lorsque les plantes sont cultivées en chambre de culture, la modification d'un paramètre abiotique peut être facilement mise en relation avec une réponse spécifique de la plante. Dans nos expériences, les chambres de cultures ont permis de réguler des facteurs abiotiques comme la température et la photopériode. La température était fixée le jour soit à 21, 24 ou 27°C et la photopériode jour/nuit 16h/8h ; la température était diminuée de 2°C durant la période d'obscurité. Pour des raisons techniques, l'humidité relative était fixée entre 75 et 80% et l'intensité lumineuse à 155 +- 20 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Cette intensité lumineuse correspond à l'intensité d'une journée nuageuse (entre 100-200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) comparé à des intensités lumineuses lors de journées ensoleillées qui peuvent aller jusque 2000 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$. Des variations de température et d'intensité lumineuse existent aussi au sein de la chambre, bien que nous ayons essayé de les minimiser en changeant régulièrement le positionnement des plantes. Ces variations de conditions au sein de la chambre peuvent aussi induire des variations dans la réponse des plantes (Measures *et al.* 1973). Les chambres de culture, en fournissant un environnement propice aux manipulations expérimentales, présentent dès lors des différences notables avec l'environnement extérieur et peuvent induire un effet « chambre de culture » (Porter *et al.* 2015). Les résultats obtenus dans cette thèse doivent donc être nuancés comparativement à des conditions expérimentales sur le terrain.

6. Conclusion

Cette thèse a contribué à une meilleure compréhension des effets d'une hausse de température et d'un stress hydrique sur les espèces entomophiles. Ces différentes avancées sont un début pour une meilleure projection des conséquences des changements climatiques sur les interactions plantes-pollinisateurs.

En conclusion, nos résultats ont montré qu'une hausse de température et un stress hydrique influencent le développement végétatif et plus encore, le développement reproducteur des espèces étudiées. La combinaison des stress était particulièrement délétère pendant la floraison des plantes. Bien que les espèces étudiées aient développé différentes stratégies qui limitent l'impact négatif des hausses de température et du stress hydrique sur leur croissance végétative et leurs processus physiologiques, les effets des stress se sont marqués sur les organes reproducteurs : le nombre de fleurs et leur taille ont été nettement réduits et les ressources florales des espèces annuelles ont nettement diminué. Ces effets sur le développement reproducteur peuvent résulter d'un phénomène de ré-allocation des ressources entre les organes sources et puits ; les plantes en conditions de stress investissent moins de carbohydrates dans le développement reproducteur au profit de la croissance racinaire ou végétative, ce qui leur permet de survivre malgré les stress. Ces modifications de traits floraux peuvent influencer négativement l'attractivité des fleurs vis-à-vis des pollinisateurs, ce que nous avons en outre observé *in natura* et en chambre de vol. Les pollinisateurs visitent moins fréquemment les plantes soumises soit à une hausse de température soit à un stress hydrique comparativement aux plantes contrôles. Enfin, la composition des ressources florales a été impactée à la fois par la hausse de température et le stress hydrique, mais les conséquences de ces modifications sur la nutrition des insectes reste à investiguer.

Pour les plantes entomophiles, la floraison est une étape critique, car elles doivent attirer les insectes pollinisateurs, dont certains dépendent exclusivement de leurs ressources florales comme sources de nourriture. Les effets observés de la hausse de température et du stress hydrique affecteront les interactions plantes-pollinisateurs, avec des conséquences potentiellement négatives pour les deux partenaires.

7. Perspectives

A l'issue de cette thèse, beaucoup de questions restent ouvertes, les points suivants peuvent être développés en perspectives de cette étude.

- Explorer les modifications du développement reproducteur des espèces pérennes pour mieux cerner l'influence du cycle de vie sur la réponse aux stress abiotiques. Nous avons été étonnés de voir que l'espèce bisannuelle, *E. vulgare*, est la seule dont la sécrétion de nectar n'a pas été modifiée suite à la hausse de

température et au stress hydrique. Les espèces ont des stratégies différentes pour faire face au stress (Bouzid *et al.* 2019). Phillips *et al.* (2018) ont également montré des résistances des plantes différentes face à la sécheresse, certaines espèces maintenant aussi leur production de nectar dans des conditions de stress hydrique. Réitérer les expériences en choisissant d'autres espèces pérennes entomophiles pourrait compléter cette thèse de manière intéressante, même si cela nécessite de cultiver des plantes durant plusieurs années. Il serait aussi complémentaire d'étudier d'autres familles de plantes annuelles ; en effet, dans cette thèse, nous nous sommes particulièrement concentrés sur les Boraginaceae.

- Poursuivre l'observation de la modification des signaux floraux en travaillant sur la couleur et sur les odeurs. Nous avons remarqué lors de plusieurs expériences, une tendance des fleurs à « s'éclaircir » avec l'intensité des stress, néanmoins, il était difficile de quantifier ces modifications sur *B. officinalis* ou *Echium* spp. Les corolles changent de couleur passant du rose au bleu sur la durée de l'anthèse. En faisant des essais préliminaires sur d'autres espèces (2019), comme *Papaver rhoeas*, le changement de couleur était assez net. Par ailleurs, les odeurs (composés organiques volatiles) influencent particulièrement l'attractivité des fleurs vis-à-vis des pollinisateurs (Junker and Parachnowitsch 2015). Or, les VOCs sont très sensibles à la température et il serait intéressant de compléter l'étude en mesurant également leur modification. Les odeurs émises par le nectar semblent déterminantes dans l'attraction des pollinisateurs (Parachnowitsch *et al.* 2019).

- Mesurer les conséquences des modifications de signaux et ressources florales sur les deux partenaires, plantes et insectes. Pour les plantes, il serait intéressant de mesurer les effets d'un comportement de visite modifié sur l'efficacité de la pollinisation et la mise à graines des plantes. Dans cette thèse, après des essais préliminaires, nous n'avons pas finalement mesuré les effets réels sur la reproduction et la formation de graines, comme cela est réalisé par exemple dans l'étude de Rering *et al.* (2020). Les Boraginaceae produisent des tétrakènes, le nombre de graines est réduit par fleur, ce qui ne permet pas une observation aisée des modifications de mise à graines. Pour les insectes pollinisateurs, il serait intéressant de tester l'effet de diète modifiée par une hausse de température et un stress hydrique sur des microcolonies ainsi que de poursuivre les analyses des modifications de compositions de ressources en parvenant à établir des ratios entre macronutriments (protéines et lipides), qui semblent déterminants pour la nutrition des insectes, au-delà des quantités absolues (Vaudo *et al.* 2020).

8. Références

Amuji CF, Beaumont LJ, Atwell BJ. **2020**. The effect of co-occurring heat and water stress on reproductive traits and yield of tomato (*Solanum lycopersicum*). *The Horticulture Journal* **89**: 530–536.

Asadi-Samani M, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M. **2014**. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **7, Supplement 1**: S22–S28.

Ashraf M, Foolad MR. **2007**. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 206–216.

Ashraf M, Harris PJC. **2013**. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* **51**: 163–190.

Aubert L, Konrádová D, Barris S, Quinet M. **2020**. Different drought resistance mechanisms between two buckwheat species *Fagopyrum esculentum* and *Fagopyrum tataricum*. *Physiologia Plantarum* **172:** 577-586.

Aubert L, Konrádová D, Kebbas S, Barris S, Quinet M. **2020**. Comparison of high temperature resistance in two buckwheat species *Fagopyrum esculentum* and *Fagopyrum tataricum*. *Journal of Plant Physiology* **251**: 153222.

Austin MW, Horack P, Dunlap AS. **2019**. Choice in a floral marketplace: the role of complexity in bumble bee decision-making. *Behavioral Ecology* **30**: 500–508.

Awasthi R, Kaushal N, Vadez V, *et al.* 2014. Individual and combined effects of transient drought and heat stress on carbon assimilation and seed filling in chickpea. *Functional Plant Biology* **41**: 1148–1167.

Balfour NJ, Ollerton J, Castellanos MC, Ratnieks FLW. **2018**. British phenological records indicate high diversity and extinction rates among late-summer-flying pollinators. *Biological Conservation* **222**: 278–283.

Barnabás B, Jäger K, Fehér A. **2008**. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment* **31**: 11–38.

Bartoli CG, Casalongué CA, Simontacchi M, Marquez-Garcia B, Foyer CH. **2013**. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany* **94**: 73–88.

Bernier G, Kinet J-M, Sachs RM. **1981**. *The physiology of flowering*. CRC press Boca Raton, FL.

Bertsch A. **1983**. Nectar production of *Epilobium angustifolium* L. at different air humidities; nectar Sugar in individual flowers and the optimal foraging theory. *Oecologia* **59**: 40–48.

Blarer A, Keasar T, Shmida A. **2002**. Possible mechanisms for the formation of flower size preferences by foraging bumblebees. *Ethology* **108**: 341–351.

Borghi M, Perez de Souza L, Yoshida T, Fernie AR. **2019**. Flowers and climate change: a metabolic perspective. *New Phytologist* **224**: 1425–1441.

Borrell BJ. **2005**. Long tongues and loose niches: evolution of euglossine bees and their nectar flowers. *Biotropica* **37**: 664–669.

Boutraa T, Sanders FE. **2001**. Influence of water stress on grain yield and vegetative

growth of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **187**: 251–257.

Bouzid M, He F, Schmitz G, *et al.* 2019. *Arabidopsis* species deploy distinct strategies to cope with drought stress. *Annals of Botany* **124**: 27–40.

Bowers JE, Dimmitt MA. 1994. Flowering phenology of six woody plants in the northern sonoran desert. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **121**: 215–229.

Brodschneider R, Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**: 278–294.

Carroll AB, Pallardy SG, Galen C. 2001. Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* **88**: 438–446.

Cartar RV. 2004. Resource tracking by bumble bees: responses to plant-level differences in quality. *Ecology* **85**: 2764–2771.

Carter C, Shafir S, Yehonatan L, Palmer RG, Thornburg R. 2006. A novel role for proline in plant floral nectars. *Naturwissenschaften* **93**: 72–79.

Carvell C, Bourke AFG, Dreier S, *et al.* 2017. Bumblebee family lineage survival is enhanced in high-quality landscapes. *Nature* **543**: 547–549.

Chabert S, Sénéchal C, Fougeroux A, *et al.* 2020. Effect of environmental conditions and genotype on nectar secretion in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *OCL* **27**: 51.

Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, *et al.* 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* **89**: 907–916.

Chittka L, Gumbert A, Kunze J. 1997. Foraging dynamics of bumble bees: correlates of movements within and between plant species. *Behavioral Ecology* **8**: 239–249.

Chittka L, Thomson JD, Waser NM. 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* **86**: 361–377.

Clearwater MJ, Revell M, Noe S, Manley-Harris M. 2018. Influence of genotype, floral stage, and water stress on floral nectar yield and composition of mānuka (*Leptospermum scoparium*). *Annals of Botany* **121**: 501–512.

Cohen I, Zandalinas SI, Huck C, Fritschi FB, Mittler R. 2021. Meta-analysis of drought and heat stress combination impact on crop yield and yield components. *Physiologia Plantarum* **171**: 66–76.

Connor DJ, Jones TR. 1985. Response of sunflower to strategies of irrigation II. Morphological and physiological responses to water stress. *Field Crops Research* **12**: 91–103.

Cook SM, Awmack CS, Murray DA, Williams IH. 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* **28**: 622–627.

Corbet S. 2003. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. *Apidologie* **34**: 1–10.

Dai A. 2013. Increasing drought under global warming in observations and models. *Nature Climate Change* **3**: 52–58.

De la Barrera E, Nobel PS. 2004. Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in Plant Science* **9**: 65–69.

Descamps C, Quinet M, Jacquemart A-L. 2021. The effects of drought on plant–

pollinator interactions: What to expect? *Environmental and Experimental Botany* **182**: 104297.
Dreisig H. **2012**. How long to stay on a plant: the response of bumblebees to encountered nectar levels. *Arthropod-Plant Interactions* **6**: 315–325.
Duan H, Wu J, Huang G, *et al.* 2017. Individual and interactive effects of drought and heat on leaf physiology of seedlings in an economically important crop. *AoB PLANTS* **9**.
Dusenge ME, Duarte AG, Way DA. **2019**. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO_2 and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytologist* **221**: 32–49.
Ermolli I, Matthes K, Dudok de Wit T, *et al.* 2013. Recent variability of the solar spectral irradiance and its impact on climate modelling. *Atmospheric Chemistry and Physics* **13**: 3945–3977.
Fábián A, Sáfrán E, Szabó-Eitel G, Barnabás B, Jäger K. **2019**. Stigma functionality and fertility are reduced by heat and drought co-stress in wheat. *Frontiers in Plant Science* **10**.
Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, *et al.* 2017. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science* **8**.
Fang X, Turner NC, Yan G, Li F, Siddique KHM. **2010**. Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. *Journal of Experimental Botany* **61**: 335–345.
Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. **2009**. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **29**: 185–212.
Feller U. **2016**. Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. *Journal of Plant Physiology* **203**: 84–94.
Firon N, Pressman E, Meir S, Khoury R, Altahan L. **2012**. Ethylene is involved in maintaining tomato (*Solanum lycopersicum*) pollen quality under heat-stress conditions. *AoB PLANTS* **2012**.
Fisogni A, Massol F, de Manincor N, *et al.* 2021. Network analysis highlights increased generalisation and evenness of plant-pollinator interactions after conservation measures. *Acta Oecologica* **110**: 103689.
Freeman CE, Head KC. **1990**. Temperature and sucrose composition of floral nectars in ipomopsis longiflora under field conditions. *The Southwestern Naturalist* **35**: 423–426.
Galen C. **1999**. Why do flowers vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioScience* **49**: 631–640.
Gallagher MK, Campbell DR. **2017**. Shifts in water availability mediate plant–pollinator interactions. *New Phytologist* **215**: 792–802.
Génissel A, Aupinel P, Bressac C, Tasei J-N, Chevrier C. **2002**. Influence of pollen origin on performance of *Bombus terrestris* micro-colonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **104**: 329–336.
Gerard M, Michez D, Debat V, *et al.* 2018. Stressful conditions reveal decrease in size, modification of shape but relatively stable asymmetry in bumblebee wings. *Scientific Reports* **8**: 15169.
Gérard M, Vanderplanck M, Wood T, Michez D. **2020**. Global warming and plant–

pollinator mismatches. *Emerging Topics in Life Sciences*.
Ghanem ME, Van Elteren J, Albacete A, *et al.* 2009. Impact of salinity on early reproductive physiology of tomato (*Solanum lycopersicum*) in relation to a heterogeneous distribution of toxic ions in flower organs. *Functional Plant Biology* **36**: 125–136.
Ghisbain G, Gérard M, Wood T, Michez D. **2021**. Expanding insect pollinators in the Anthropocene. *Biological Reviews* **accepted**.
Gil V, Gaertner MA, Gutierrez C, Losada T. **2019**. Impact of climate change on solar irradiation and variability over the Iberian Peninsula using regional climate models. *International Journal of Climatology* **39**: 1733–1747.
Gómez JM, Bosch J, Perfectti F, Fernández J d, Abdelaziz M, Camacho J p. m. **2008**. Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 2241–2249.
Gómez JM, Perfectti F, Armas C, *et al.* 2020. Within-individual phenotypic plasticity in flowers fosters pollination niche shift. *Nature Communications* **11**: 4019.
González-Varo JP, Biesmeijer JC, Bommarco R, *et al.* 2013. Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology & Evolution* **28**: 524–530.
Goulson D. **2010**. *Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation*. Oxford University Press on Demand.
Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. **2015**. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**.
Gray SB, Brady SM. **2016**. Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology* **419**: 64–77.
de Groot AP. **1952**. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Oecologia* **3**: 197–285.
Gumbert A. **2000**. Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*): innate preferences and generalization after learning. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **48**: 36–43.
Guo YM, Chen S, Nelson MN, Cowling W, Turner NC. **2013**. Delayed water loss and temperature rise in floral buds compared with leaves of Brassica rapa subjected to a transient water stress during reproductive development. *Functional Plant Biology* **40**: 690–699.
Gupta M, Singh S. **2010**. *Borago officinalis* Linn. An important medicinal plant of Mediterranean region: Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **5**: 27–34.
Halpern SL, Adler LS, Wink M. **2010**. Leaf herbivory and drought stress affect floral attractive and defensive traits in Nicotiana quadrivalvis. *Oecologia* **163**: 961–971.
Hamann E, Denney D, Day S, *et al.* 2021. Review: Plant eco-evolutionary responses to climate change: Emerging directions. *Plant Science* **304**: 110737.
Hedhly A. **2011**. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. *Environmental and Experimental Botany* **74**: 9–16.
Heil M. **2011**. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* **16**: 191–200.
Hoover SE, Ladley JJ, Shchepetkina AA, Tisch M, Gieseg SP, Tylianakis JM. **2012**.

Warming, CO2, and nitrogen deposition interactively affect a plant-pollinator mutualism. *Ecology letters* **15**: 227–234.

Hrassnigg N, Crailsheim K. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **36**: 255–277.

Huber RE, Mathison RD. 1976. Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (*Apis mellifera*). *Canadian Journal of Biochemistry* **54**: 153–164.

Jakobsen HB, Kritjánsson K. 1994. Influence of Temperature and Floret Age on Nectar Secretion in Trifolium repens L. *Annals of Botany* **74**: 327–334.

Ji X, Shiran B, Wan J, *et al.* 2010. Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant, Cell & Environment* **33**: 926–942.

Junker RR, Parachnowitsch AL. 2015. Working towards a holistic view on flower traits-how floral scents mediate plant-animal interactions in concert with other floral characters. *Journal of the Indian Institute of Science* **95**: 43–67.

Kay KM, Picklum DA. 2013. Drought alters the expression of mating system traits in two species of Clarkia. *Evolutionary Ecology* **27**: 899–910.

Klemow KM, Clements DR, Threadgill PF, Cavers PB. 2002. The biology of Canadian weeds. 116. *Echium vulgare* L. *Canadian Journal of Plant Science* **82**: 235–248.

Kooyers NJ. 2015. The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Science* **234**: 155–162.

Korres NE, Norsworthy JK, Tehranchian P, *et al.* 2016. Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **36**: 12.

Lamaoui M, Jemo M, Datla R, Bekkaoui F. 2018. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry* **6**.

Lambrecht SC, Morrow A, Hussey R. 2017. Variation in and adaptive plasticity of flower size and drought-coping traits. *Plant Ecology* **218**: 647–660.

Latty T, Trueblood JS. 2020. How do insects choose flowers? A review of multi-attribute flower choice and decoy effects in flower-visiting insects. *Journal of Animal Ecology* **89**: 2750–2762.

Lavergne S, Molina J, Debussche M. 2006. Fingerprints of environmental change on the rare mediterranean flora: a 115-year study. *Global Change Biology* **12**: 1466–1478.

Lawlor DW, Cornic G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* **25**: 275–294.

Lawson SP, Kennedy KB, Rehan SM. 2021. Pollen composition significantly impacts the development and survival of the native small carpenter bee, *Ceratina calcarata*. *Ecological Entomology* **46**: 232–239.

Lázaro-Nogal A, Matesanz S, Godoy A, Pérez-Trautman F, Gianoli E, Valladares F. 2015. Environmental heterogeneity leads to higher plasticity in dry-edge populations of a semi-arid Chilean shrub: insights into climate change responses. *Journal of Ecology* **103**: 338–350.

Leadbeater E, Chittka L. 2007. social learning in insects — from miniature brains to consensus building. *Current Biology* **17**: R703–R713.

Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D. 2010. Proline metabolism and

transport in plant development. *Amino Acids* **39**: 949–962.
Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, *et al.* 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* **4**.
Leonard AS, Dornhaus A, Papaj DR. 2011. Flowers help bees cope with uncertainty: signal detection and the function of floral complexity. *Journal of Experimental Biology* **214**: 113–121.
Liu Y, Mu J, Niklas KJ, Li G, Sun S. 2012. Global warming reduces plant reproductive output for temperate multi-inflorescence species on the Tibetan plateau. *New Phytologist* **195**: 427–436.
Liu Y-H, Offler CE, Ruan Y-L. 2013. Regulation of fruit and seed response to heat and drought by sugars as nutrients and signals. *Frontiers in Plant Science* **4**.
López J, Way DA, Sadok W. 2021. Systemic effects of rising atmospheric vapor pressure deficit on plant physiology and productivity. *Global Change Biology* **27**: 1704–1720.
Luizzi VJ, Friberg M, Petrén H. 2021. Phenotypic plasticity in floral scent in response to nutrient, but not water, availability in the perennial plant *Arabis alpina* (Brassicaceae). *Functional Ecology* **n/a**.
Mahalingam R, Bregitzer P. 2019. Impact on physiology and malting quality of barley exposed to heat, drought and their combination during different growth stages under controlled environment. *Physiologia Plantarum* **165**: 277–289.
Mariotti F. 2017. *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*. Academic Press.
Mathieu A-S, Lutts S, Vandoorne B, *et al.* 2014. High temperatures limit plant growth but hasten flowering in root chicory (*Cichorium intybus*) independently of vernalisation. *Journal of Plant Physiology* **171**: 109–118.
McAlpine KG, Jesson LK, Kubien DS. 2008. Photosynthesis and water-use efficiency: a comparison between invasive (exotic) and non-invasive (native) species. *Austral Ecology* **33**: 10–19.
Measures M, Weinberger P, Baer H. 1973. Variability of plant growth within controlled-environment chambers as related to temperature and light distribution. *Canadian Journal of Plant Science* **53**: 215–220.
Moerman R, Roger N, Jonghe RD, Michez D, Vanderplanck M. 2016. Interspecific variation in bumblebee performance on pollen diet: new insights for mitigation strategies. *PLOS ONE* **11**: e0168462.
Moerman R, Vanderplanck M, Fournier D, Jacquemart AL, Michez D. 2017. Pollen nutrients better explain bumblebee colony development than pollen diversity. *Insect Conservation and Diversity* **10**: 171–179.
Moerman R, Vanderplanck M, Roger N, *et al.* 2015. Growth rate of bumblebee larvae is related to pollen amino acids. *Journal of Economic Entomology* **109**: 25–30.
Morrison MJ, Stewart DW. 2002. Heat stress during flowering in summer *Brassica*. *Crop Science* **42**: 797–803.
Mu J, Peng Y, Xi X, *et al.* 2015. Artificial asymmetric warming reduces nectar yield in a Tibetan alpine species of Asteraceae. *Annals of Botany* **116**: 899–906.
Muhl QE, Toit ES du, Steyn JM, Apostolides Z. 2014. Bud development, flowering and fruit set of *Moringa oleifera* Lam. (Horseradish Tree) as affected by various irrigation

levels. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics (JARTS)* **114**: 79–87.

Muth F, Francis JS, Leonard AS. **2016**. Bees use the taste of pollen to determine which flowers to visit. *Biology Letters* **12**: 20160356.

Nicolson SW, Thornburg RW. **2007**. Nectar chemistry In: *Nectaries and nectar*. Springer, 215–264.

Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, *et al.* 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science* **15**: 684–692.

Nikkeshi A, Kuramitsu K, Yokoi T, Yamaji K. **2021**. Simple methods of analyzing proteins and amino acids in small pollen samples. *Journal of Apicultural Research* **0**: 1–7.

Orians CM, Schweiger R, Dukes JS, Scott ER, Müller C. **2019**. Combined impacts of prolonged drought and warming on plant size and foliar chemistry. *Annals of Botany* **124**: 41–52.

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP. **2014**. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Pacini E, Nepi M. **2007**. Nectar production and presentation In: *Nectaries and Nectar*.167–214.

Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M. **2015**. Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **6**: 723.

Parachnowitsch AL, Manson JS, Sletvold N. **2019**. Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany* **123**: 247–261.

Paupière MJ, Müller F, Li H, *et al.* 2017. Untargeted metabolomic analysis of tomato pollen development and heat stress response. *Plant Reproduction* **30**: 81–94.

Pearce RB, Brown RH, Blaser RE. **1968**. Photosynthesis of *Alfalfa* leaves as influenced by age and environment. *Crop Science* **8**: cropsci1968.0011183X000800060011x.

Petanidou T, Smets E. **1996**. Does temperature stress induce nectar secretion in Mediterranean plants? *New Phytologist* **133**: 513–518.

Phillips BB, Shaw RF, Holland MJ, *et al.* 2018. Drought reduces floral resources for pollinators. *Global Change Biology* **24**: 3226–3235.

Pinheiro C, Chaves MM. **2011**. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany* **62**: 869–882.

Porch TG, Jahn M. **2001**. Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell & Environment* **24**: 723–731.

Porter AS, Evans-Fitz.Gerald C, McElwain JC, Yiotis C, Elliott-Kingston C. **2015**. How well do you know your growth chambers? Testing for chamber effect using plant traits. *Plant Methods* **11**: 44.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. **2010**. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 345–353.

Prasad PVV, Djanaguiraman M, Perumal R, Ciampitti IA. **2015**. Impact of high temperature stress on floret fertility and individual grain weight of grain sorghum: sensitive stages and thresholds for temperature and duration. *Frontiers in Plant Science* **6**.

Prasad PVV, Staggenborg SA, Ristic Z. **2008**. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. *Response of crops to limited water: understanding and modeling water stress effects on plant growth processes*: 301–355.

Pressman E, Peet MM, Pharr DM. **2002**. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Annals of Botany* **90**: 631–636.

Pyke GH. **2016**. Floral nectar: pollinator attraction or manipulation? *Trends in Ecology & Evolution* **0**.

Qaderi MM, Kurepin LV, Reid DM. **2012**. Effects of temperature and watering regime on growth, gas exchange and abscisic acid content of canola (*Brassica napus*) seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **75**: 107–113.

Quinet M, Descamps C, Coster Q, Lutts S, Jacquemart A-L. **2015**. Tolerance to water stress and shade in the invasive Impatiens parviflora. *International Journal of Plant Sciences* **176**: 848–858.

Raguso RA. **2004**. Flowers as sensory billboards: progress towards an integrated understanding of floral advertisement. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 434–440.

Rawson HM, Begg JE, Woodward RG. **1977**. The effect of atmospheric humidity on photosynthesis, transpiration and water use efficiency of leaves of several plant species. *Planta* **134**: 5–10.

Requier F, Jowanowitsch KK, Kallnik K, Steffan-Dewenter I. **2019.** Limitation of complementary resources affects colony growth, foraging behavior, and reproduction in bumble bees. *Ecology* **101**: e02946.

Rering CC, Franco JG, Yeater KM, Mallinger RE. **2020**. Drought stress alters floral volatiles and reduces floral rewards, pollinator activity, and seed set in a global plant. *Ecosphere* **11**: e03254.

Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, *et al.* 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 19631–19636.

Rizhsky L, Liang H, Mittler R. **2002**. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* **130**: 1143–1151.

Ropars L, Affre L, Schurr L, *et al.* 2020. Land cover composition, local plant community composition and honeybee colony density affect wild bee species assemblages in a Mediterranean biodiversity hot-spot. *Acta Oecologica* **104**: 103546.

Rortais A, Arnold G, Halm M-P, Touffet-Briens F. **2005**. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* **36**: 71–83.

Roth T, Kohli L, Rihm B, Achermann B. **2013**. Nitrogen deposition is negatively related to species richness and species composition of vascular plants and bryophytes in Swiss mountain grassland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **178**: 121–126.

Rotheray EL, Osborne JL, Goulson D. **2017**. Quantifying the food requirements and effects of food stress on bumble bee colony development. *Journal of Apicultural Research* **56**: 288–299.

Roy R, Schmitt AJ, Thomas JB, Carter CJ. **2017**. Review: Nectar biology: From

molecules to ecosystems. *Plant Science* **262**: 148–164.
Ruan Y-L, Patrick J, Bouzayen M, Osorio S, Fernie AR. **2012**. Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science* **17**: 656–665.
Ruedenauer FA, Leonhardt SD, Lunau K, Spaethe J. **2019**. Bumblebees are able to perceive amino acids via chemotactile antennal stimulation. *Journal of Comparative Physiology A* **205**: 321–331.
Saddhe AA, Manuka R, Penna S. **2021**. Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. *Physiologia Plantarum* **171**: 739–755.
Sage TL, Bagha S, Lundsgaard-Nielsen V, Branch HA, Sultmanis S, Sage RF. **2015**. The effect of high temperature stress on male and female reproduction in plants. *Field Crops Research* **182**: 30–42.
Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ. **2004**. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiology* **134**: 1460–1470.
Sato S, Kamiyama M, Iwata T, Makita N, Furukawa H, Ikeda H. **2006**. Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of lycopersicon esculentum by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany* **97**: 731–738.
Sehgal A, Sita K, Bhandari K, *et al.* 2019. Influence of drought and heat stress, applied independently or in combination during seed development, on qualitative and quantitative aspects of seeds of lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes, differing in drought sensitivity. *Plant, Cell & Environment* **42**: 198–211.
Sevanto S. **2014**. Phloem transport and drought. *Journal of Experimental Botany* **65**: 1751–1759.
Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, *et al.* 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics*. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2343–2351.
Sheldon KS. **2019**. Climate change in the tropics: ecological and evolutionary responses at low latitudes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **50**: 303–333.
Simanonok MP, Otto CRV, Smart MD. **2020**. Do the quality and quantity of honey bee-collected pollen vary across an agricultural land-use gradient? *Environmental Entomology* **49**: 189–196.
Simon ADF, Marx HE, Starzomski BM. Phylogenetic restriction of plant invasion in drought-stressed environments: Implications for insect-pollinated plant communities in water-limited ecosystems. *Ecology and Evolution* **n/a**.
Sivakumar R, Srividhya S. **2016**. Impact of drought on flowering, yield and quality parameters in diverse genotypes of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Advances in Horticultural Science* **30**: 3-11–11.
Snider JL, Oosterhuis DM. **2011**. How does timing, duration, and severity of heat stress influence pollen-pistil interactions in angiosperms? *Plant Signaling & Behavior* **6**: 930–933.
Somme L, Vanderplanck M, Michez D, *et al.* 2014. Pollen and nectar quality drive the major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie* **46**: 92–106.
Souza PID, Egli DB, Bruening WP. **1997**. Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. *Agronomy Journal* **89**: 807–812.
Stanton ML, Preston RE. **1988**. Ecological consequences and phenotypic correlates of

petal size variation in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **75**: 528–539.

Suni SS, Ainsworth B, Hopkins R. 2020. Local adaptation mediates floral responses to water limitation in an annual wildflower. *American Journal of Botany* **107**: 209–218.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. 2015. *Plant physiology and development*. Sinauer Associates Incorporated.

Takkis K, Tscheulin T, Petanidou T. 2018. Differential effects of climate warming on the nectar secretion of early- and late-flowering Mediterranean plants. *Frontiers in Plant Science* **9**.

Tambussi E a., Bort J, Araus J l. 2007. Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology* **150**: 307–321.

Teulier L, Weber J-M, Crevier J, Darveau C-A. 2016. Proline as a fuel for insect flight: enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proceedings: Biological Sciences* **283**: 1–8.

Thomson DM. 2016. Local bumble bee decline linked to recovery of honey bees, drought effects on floral resources. *Ecology Letters* **19**: 1247–1255.

Vanderplanck M, Martinet B, Carvalheiro LG, *et al.* 2019. Ensuring access to high-quality resources reduces the impacts of heat stress on bees. *Scientific Reports* **9**.

Vanderplanck M, Moerman R, Rasmont P, *et al.* 2014. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PLoS ONE* **9**: e86209.

Vasiliev D, Greenwood S. 2021. The role of climate change in pollinator decline across the Northern Hemisphere is underestimated. *Science of The Total Environment* **775**: 145788.

Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM. 2015. Bee nutrition and floral resource restoration. *Current Opinion in Insect Science* **10**: 133–141.

Vaudo AD, Tooker JF, Patch HM, *et al.* 2020. Pollen Protein: Lipid Macronutrient Ratios May Guide Broad Patterns of Bee Species Floral Preferences. *Insects* **11**: 132.

Vervoort A, Cawoy V, Jacquemart A-L. 2011. Comparative reproductive biology in co-occurring invasive and native Impatiens species. *International Journal of Plant Sciences* **172**: 366–377.

Vile D, Pervent M, Belluau M, *et al.* 2012. *Arabidopsis* growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? *Plant, Cell & Environment* **35**: 702–718.

Villarreal AG, Freeman CE. 1990. Effects of temperature and water stress on some floral nectar characteristics in *Ipomopsis longiflora* (Polemoniaceae) under controlled conditions. *Botanical Gazette* **151**: 5–9.

de Vries W. 2021. Impacts of nitrogen emissions on ecosystems and human health: A mini review. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **21**: 100249.

Willmer P. 2011. *Pollination and Floral Ecology*. Princeton University Press.

Woodard SH, Jha S. 2017. Wild bee nutritional ecology: predicting pollinator population dynamics, movement, and services from floral resources. *Current Opinion in Insect Science* **21**: 83–90.

Wu CA, Lowry DB, Nutter LI, Willis JH. 2010. Natural variation for drought-response traits in the *Mimulus guttatus* species complex. *Oecologia* **162**: 23–33.

Xu Y, Huang B. **2007**. Heat-induced leaf senescence and hormonal changes for thermal bentgrass and turf-type bentgrass species differing in heat tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **132**: 185–192.

Yu J, Jiang M, Guo C. **2019**. Crop pollen development under drought: from the phenotype to the mechanism. *International Journal of Molecular Sciences* **20**.

Yuan W, Zheng Y, Piao S, *et al.* 2019. Increased atmospheric vapor pressure deficit reduces global vegetation growth. *Science Advances* **5**: eaax1396.

Zandalinas SI, Mittler R, Balfagón D, Arbona V, Gómez-Cadenas A. **2018**. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum* **162**: 2–12.

Zhou R, Yu X, Ottosen C-O, *et al.* 2017. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biology* **17**: 24.

Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF. **2010**. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*: erq053.

Ziska LH, Pettis JS, Edwards J, *et al.* 2016. Rising atmospheric CO2 is reducing the protein concentration of a floral pollen source essential for North American bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**: 20160414.

Productions scientifiques durant la thèse

Monographie

1. Jacquemart, Anne-Laure, & **Descamps, Charlotte**. (2019). *Flore écologique de Belgique suivant la classification APG IV* (2d Ed.). Editions Erasme. 648 pp.
2. Jacquemart, Anne-Laure, & **Descamps, Charlotte**. (2018). *Flore écologique de Belgique suivant la classification APG IV*. Editions Erasme. 632 pp.

Article de périodique

1. **Descamps, Charlotte**, Gaspard, François, Delmelle, Pierre, Jacquemart, Anne-Laure, & Lecoq, Julie (2021). Accompagner les étudiants bacheliers bioingénieurs dans le développement de leurs compétences transversales. *Les Annales de QPES*, *1*(3), doi :10.14428/qpes.v1i3.62103
2. **Descamps, Charlotte**, Boubnan, Najet, Jacquemart, Anne-Laure, & Quinet, Muriel (2021). Growing and flowering in a changing climate: Effects of higher temperatures and drought stress on the bee-pollinated species *Impatiens glandulifera* Royle. *Plants*, *10*, 988. doi :10.3390/plants10050988
3. **Descamps, Charlotte**, Quinet, Muriel, & Jacquemart, Anne-Laure (2021). The effects of drought on plant–pollinator interactions: What to expect?. *Environmental and Experimental Botany*, *182*, 104297. doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104297
4. **Descamps, Charlotte**, Jambrek, Anne, Quinet, Muriel, & Jacquemart, Anne-Laure (2021). Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. *Insects*, *12*, 493. doi :10.3390/ insects12060493
5. Lobet, Guillaume, **Descamps, Charlotte**, Leveau, Lola, Guillet, Alain, & Rees, Jean-François (2021). QuoVidi: An open-source web application for the organization of large-scale biological treasure hunts. *Ecology and Evolution, 11,* 3516-3526. doi: 10.1002/ece3.7130
6. **Descamps, Charlotte**, Jacquemart, Anne-Laure, & Quinet, Muriel (2020). Sécheresses, vagues de chaleur à répétition…une menace pour les interactions plantes-pollinisateurs ? *Carnets des espaces naturels*, *6*, 13-15.
7. **Descamps, Charlotte**, & Jacquemart, Anne-Laure (2020). Le colchique d'automne, une automnale des zones humides. *Carnets des espaces naturels*, *6*, 34-35.
8. Jacquemart, Anne-Laure, **Descamps, Charlotte**, & Carbonnelle, Sébastien (2020). De la diversité dans les coquelicots. *Carnets des espaces naturels*, *5*, 30-31.
9. **Descamps, Charlotte**, & Jacquemart, Anne-Laure (2020). Les plaisirs du printemps : découvrir les anémones. *Carnets des espaces naturels*, *4*, 26-27.
10. **Descamps, Charlotte**, Marée, Sophie, Hugon, Sophie, Quinet, Muriel, & Jacquemart, Anne-Laure (2020). Species-specific responses to combined water

stress and increasing temperatures in two bee-pollinated congeners (*Echium*, Boraginaceae). *Ecology and Evolution*, *10*, 6549-6561. doi :10.1002/ece3.6389

11. Jacquemart, Anne-Laure, & **Descamps, Charlotte** (2019). Bien finir la saison botanique, de jolies automnales, les gentianes. *Carnets des espaces naturels*, *3*, 30-31.
12. Carbonnelle, Sebastien, Jacquemart, Anne-Laure, & **Descamps, Charlotte** (2019). Les petites véroniques printanières à la loupe. *Carnets des espaces naturels*, *1 (2019)*, 32-33.
13. Jacquemart, Anne-Laure, & **Descamps, Charlotte** (2018). Flore ecologique de belgique : un nouvel outil pour les débutants botanistes. *Carnets des espaces naturels*, 2, 13-15.
14. Jacquemart, Anne-Laure, & **Descamps, Charlotte** (2018). Pourquoi proposer une nouvelle Flore de Belgique ? *Forêt.nature*, *148*, 7-10.
15. **Descamps, Charlotte**, & Jacquemart, Anne-Laure (2018). Pourquoi proposer une nouvelle Flore écologique de Belgique?. *Abeilles & cie*, *185*, 27.
16. **Descamps, Charlotte**, Quinet, Muriel, Baijot, Aurélie, & Jacquemart, Anne-Laure (2018). Temperature and water stress affect plant–pollinator interactions in *Borago officinalis* (Boraginaceae). *Ecology and Evolution*, *8*(6), 3443-3456. doi :10.1002/ece3.3914
17. Carbonelle, S, Jacquemart, Anne-Laure, & **Descamps, Charlotte** (2018). la clé du genre *Crataegus*. Notre 'banale' aubépine cache bien son style. *Carnets des espaces naturels*, *1*, 23.
18. Jacquemart, Anne-Laure, Lhoir, Pierre, Binard, Fabian, & **Descamps, Charlotte** (2016). An Interactive Multimedia Dichotomous Key for Teaching Plant Identification. *Journal of Biological Education*, 11 p. doi :10.1080/00219266.2016.1150870
19. **Descamps, Charlotte**, Moquet, Laura, Migon, Marc, & Jacquemart, Anne-Laure (2015). Diversity of the Insect Visitors on Calluna vulgaris (Ericaceae) in Southern France Heathlands. *Journal of Insect Science*, *15*, 1-5. doi:10.1093/jisesa/iev116
20. Quinet, Muriel, **Descamps, Charlotte**, Coster, Quentin, Lutts, Stanley, & Jacquemart, Anne-Laure (2015). Tolerance to water stress and shade in the invasive Impatiens parviflora. *International Journal of Plant Sciences*, *176*(9), 848-858. doi :10.1086/683276

Communication à un colloque

1. **Descamps, Charlotte**, Gaspard, François, Delmelle, Pierre, & Jacquemart, Anne-Laure (2019). Accompagner la dynamique de groupe dans un projet transdisciplinaire: un pari gagné avec 180 étudiants bioingénieurs. *Donnees Cles de l'Enseignement Superieur et de la Recherche dans le Pays de Brest*, 15 p.
2. Jacquemart, Anne-Laure, Moquet, Laura, Ouvrard, Pierre, & **Descamps, Charlotte** (2019). De ce que peuvent-nous révéler les compositions chimiques

des pollens sur les réseaux plantes-pollinisateurs. Communication présentée à 1ère Réunion Annuelle du GDR Pollinéco, Montpellier.

3. **Descamps, Charlotte**, Quinet, Muriel, & Jacquemart, Anne-Laure (2018). Temperature rise and water stress modify floral signals of bee-visited plants. Communication présentée à Annual Meeting of Plant Ecology and Evolution, Meise.
4. **Descamps, Charlotte**, Baijot, Aurélie, & Jacquemart, Anne-Laure (2016). Do climate changes modify floral resources of *Borago officinalis* for pollinators ? Communication présentée à Plant Biology Europe EPSO/ FESPB 2016 Congress, Praha, Czech Republic.
5. **Descamps, Charlotte**, Moquet, Laura, & Jacquemart, Anne-Laure (2016). Study of the insect visitor guild on *Calluna vulgaris* in heathlands at mont Lozère (France). Communication présentée à 3rd Annual Meeting of Plant Ecology and Evolution, Gent, Belgium.