



HAL
open science

**Impact de la propagation asexuée et du système
d'auto-incompatibilité gamétophytique sur la
structuration et l'évolution de la diversité génétique
d'une essence forestière entomophile et disséminée,
Prunus avium L.**

Solenn Stoeckel

► **To cite this version:**

Solenn Stoeckel. Impact de la propagation asexuée et du système d'auto-incompatibilité gamétophytique sur la structuration et l'évolution de la diversité génétique d'une essence forestière entomophile et disséminée, Prunus avium L.. Life Sciences [q-bio]. ENGREF (AgroParisTech), 2006. English. NNT : 06ENGR0008 . pastel-00002599

HAL Id: pastel-00002599

<https://pastel.hal.science/pastel-00002599>

Submitted on 11 Oct 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ECOLE NATIONALE DU GENIE RURAL, DES EAUX ET DES FORÊTS

N° attribué par la bibliothèque
/ / / / / / / / / / / / / / /

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'ENGREF

Spécialité :

Sciences Forestières

présentée et soutenue publiquement par

Solenn STOECKEL

le 16 mai 2006

à l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts

Centre de : Paris

TITRE :

Impact de la propagation asexuée et du système d'auto-incompatibilité gamétophytique sur la structuration et l'évolution de la diversité génétique d'une essence forestière entomophile et disséminée, *Prunus avium* L.

devant le jury suivant :

| | | |
|---------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Pr. Markus FISCHER | Université de Potsdam | Rapporteur |
| Dr. Sylvain GLÉMIN | Université de Montpellier II | Examineur |
| Pr. Jérôme GOUDET | Université de Lausanne | Rapporteur |
| Dr. François LEFÈVRE | INRA, Avignon | Examineur |
| Dr. Nathalie FRASCARIA-LACOSTE | ENGREF, Orsay | Co-directrice de thèse |
| Dr. Stéphanie MARIETTE | INRA, Bordeaux | Co-directrice de thèse |

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Sommaire | 2 |
| Résumé | 5 |
| Abstract | 7 |
| Remerciements | 9 |
| Avant-propos | 11 |
| Introduction | 13 |
| <i>Diversité des systèmes de reproduction chez les plantes</i> | 13 |
| <i>La propagation asexuée</i> | 14 |
| <i>Le système d'auto incompatibilité gamétophytique</i> | 15 |
| <i>Occurrence des espèces combinant propagation asexuée et SI</i> | 16 |
| <i>Propagation partiellement asexuée combinée à un GSI : un « paradoxe » évolutif ?</i> | 17 |
| <i>Questionnement scientifique de la thèse</i> | 18 |
| <i>Caractéristiques de l'espèce étudiée : Prunus avium L.</i> | 19 |
| <i>Intérêt de l'étude du système de reproduction pour la mise en place d'une stratégie de conservation des ressources génétiques sur Prunus avium L.</i> | 21 |
| <i>Contexte international et national pour la conservation des ressources génétiques des espèces forestières</i> | 21 |
| <i>Pourquoi conserver les ressources génétiques du merisier ?</i> | 21 |
| <i>Stratégie de mise en place du réseau de conservation chez le merisier : in situ et/ou ex situ</i> | 22 |
| Chapitre I : Génétique des populations d'une espèce pourvue d'un système de reproduction exotique : test des prédictions théoriques par voie expérimentale | 24 |
| <i>Introduction</i> | 24 |
| I). <i>Prédictions théoriques de l'impact de la clonalité et du GSI sur les valeurs des F-statistiques</i> | 25 |
| A). <i>Prédictions concernant l'indice de fixation intra-population: F_{IS}</i> | 25 |
| B). <i>Prédiction concernant l'indice de fixation inter-populations: F_{ST}</i> | 27 |
| II). <i>Observations expérimentales de la diversité et de sa structuration intra- et inter-populationnelle dans des populations de merisier</i> | 29 |
| A. <i>Populations étudiées</i> | 29 |
| B). <i>Analyse moléculaire des populations</i> | 30 |

| | |
|--|-----------|
| C). Méthodes d'analyses | 31 |
| D). Résultats | 32 |
| III). <i>Interprétation et discussion des résultats obtenus par voie expérimentale</i> | 35 |
| A). Comment expliquer les F_{IS} négatifs rencontrés dans les populations forestières de merisier ? | 35 |
| B). Une structuration inter-populations moyenne entre populations de merisier..... | 38 |
| C). Impact de la reproduction partiellement asexuée sur la structuration génétique inter-populations | 38 |
| D). Structuration génétique d'un locus sous sélection fréquence-dépendante négative .. | 39 |
| E). Perspectives | 40 |
| VI). <i>Distribution des fréquences alléliques pour un locus sous fréquence-dépendance dans une population structurée</i> | 43 |
| A). Hypothèses | 43 |
| B). Methodes | 45 |
| C). Résultats et discussion..... | 46 |
| Chapitre II : Impact du système de reproduction et des facteurs écologiques sur le succès reproducteur individuel chez <i>prunus avium</i> L. | 50 |
| <i>Introduction</i> | 50 |
| I). <i>Prédiction théorique de l'impact de la propagation asexuée et du GSI sur les composantes femelles et mâles des succès reproducteurs individuels</i> | 51 |
| A). Effets attendus de la propagation asexuée sur les succès reproducteurs individuels lors des phases de reproduction sexuée avec GSI | 51 |
| B). Effets attendus du GSI sur la fructification | 53 |
| II). <i>Dispositif expérimental et échantillonnage, le temps des merises</i> | 53 |
| A). Caractéristiques phénotypiques et génétiques des arbres de la population de St-Gobain | 54 |
| B). Estimation de la composante femelle du succès reproducteur individuel..... | 54 |
| C). Estimation de la composante mâle du succès reproducteur individuel | 55 |
| III). <i>Floraison, fructification et flux de pollen en population</i> | 57 |
| A). Succès de fructification | 57 |
| B). Succès de paternité | 59 |
| IV). <i>Discussion et perspectives</i> | 61 |
| A). Effet des stratégies de reproduction sur la fructification | 61 |
| B). Effet des stratégies de reproduction sur la fructification..... | 63 |

| | |
|--|-----------|
| <i>V). Le succès ? Il est fonction des modes</i> | <i>67</i> |
| Chapitre III : Discussion générale. Intérêt de nos résultats dans le cadre de la conservation et de la gestion des ressources génétiques de <i>Prunus avium</i> L. | 70 |
| <i>I). Diversité et structuration inter-populations chez une espèce à SI et drageonnage</i> | <i>70</i> |
| <i>II). Faire le clone : une stratégie risquée pour le merisier ?.....</i> | <i>73</i> |
| <i>III). Mettons nous allo-game ?.....</i> | <i>74</i> |
| <i>IV). De l'importance de conserver l'espèce, mais aussi les vecteurs biologiques de sa reproduction.....</i> | <i>75</i> |
| Bibliographie..... | 78 |
| Annexes | 89 |

RÉSUMÉ

Les systèmes de reproduction jouent un rôle fondamental dans la structuration spatiale et temporelle de la diversité génétique au sein et entre les populations d'une même espèce.

Chez les plantes, de nombreuses espèces présentent en population la capacité de se propager partiellement par voie asexuée et de se reproduire par voie sexuée sous contrôle d'un système d'auto-incompatibilité gamétophytique (GSI).

Cette thèse a pour but de mieux comprendre les implications évolutives de l'utilisation de systèmes de reproduction mixtes chez les plantes qui combinent à la fois un mode de propagation asexuée facultative et une reproduction sexuée où les croisements se font sous le contrôle d'un système d'auto-incompatibilité.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressé à l'impact de la propagation asexuée et du GSI sur la diversité génétique et sa structuration en populations. Nos résultats montrent que la prise en compte des répétitions des génotypes dues à la propagation asexuée diminue les valeurs de F_{IS} , non pas que les génotypes clonaux aient une hétérozygotie plus élevée mais parce qu'ils augmentent les fréquences des allèles qu'ils portent le plus souvent et relativisent les fréquences des autres. En conséquence, les valeurs de l'hétérozygotie attendue diminuent alors que l'hétérozygotie observée reste la même. Cependant, d'une population à l'autre, les génotypes ne portent pas les mêmes allèles. Par conséquent, la prise en compte des répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée augmente la différenciation inter-populations. Par ailleurs, nos données constituent un premier élément de confirmation de l'effet d'un locus du GSI sur des loci neutres liés et non liés, prédit par le modèle théorique de Glémin *et al.* (2001). Un locus à 2 cM du locus des GSI, un marqueur neutre présente des valeurs de diversité et de différenciation proches de celles rencontrées au locus du GSI, contrairement à d'autres loci non liés ou plus distants du GSI. Le GSI constitue un des modèles les plus étudiés pour étudier l'effet de la sélection balancée. En populations structurées, cette pression de sélection permet aux allèles S une meilleure mobilité en réduisant les effets de dérive. Cependant, le merisier possède une différenciation inter-populations médiane. Nos données empiriques soutiennent le modèle de Schierup (1998), montrant que pour des valeurs de différenciation médiane, la migration n'est pas suffisamment forte pour homogénéiser la diversité génétique des dèmes. Elle maintient de l'endémisme mais elle est, par ailleurs, suffisamment importante pour que ces allèles « endémiques » passent dans d'autres dèmes où on peut les y observer à des fréquences alléliques plus faibles que les valeurs d'équilibre attendues sous les hypothèses de Wright (1939).

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressé à l'étude de la transmission de cette diversité génétique d'une génération à l'autre par voie sexuée. Globalement chez cette espèce, peu de fleurs sont pollinisées en fruits. Par ailleurs, les participations individuelles à la création des générations suivantes sont inégales. Nos résultats montrent que la propagation asexuée n'est globalement pas un handicap pour la reproduction sexuée, elle favorise même la composante mâle des succès reproducteurs. Cependant, nous avons mis en évidence un effet de *pollen limitation* lorsque un génotype augmente le nombre de ramets du même genot dans son voisinage. Enfin, chose surprenante, nous n'observons pas d'effet de la sélection balancée sur la création de descendants. Les systèmes de reproduction alliés à une répartition spatiale qui apparaît fortement structurée semblent favoriser l'occurrence de croisements préférentiels réalisés le plus souvent entre individus spatialement proches. Cependant, une partie plus faible mais non négligeable des descendants est issue de croisements à plus longue distance. En confrontant des modèles et des concepts théoriques aux réalités biologiques, nos résultats mettent en évidence que les stratégies de reproduction participent à façonner l'évolution de la diversité génétique d'une espèce ; mais ils montrent aussi que leur effets sont probablement plus complexes voire contraires à ce que prédisent les modèles ou les concepts actuellement admis. Comprendre les effets seuls ou combinés des stratégies de reproduction nécessitera des efforts plus soutenus de la part de la communauté scientifique.

ABSTRACT

Mating systems hold key parameters to understand the evolutionary processes shaping both the genetic diversity and differentiation. Most plants can propagate through both vegetative and sexual reproduction under gametophytic self-incompatibility systems (GSI). The aim of our study was to improve the understanding of the impact of the two reproductive strategies on both genetic diversity and differentiation through time.

We studied the impact of asexual propagation and GSI on the population genetic differentiation. When clones are taken into account, heterozygote excess within populations increased. Genotypes that propagate asexually were not more heterozygous but the frequencies of the alleles preferentially shared by asexual genotypes increased while the frequencies of the alleles poorly shared by those ones decreased. Consequently, the expected heterozygosity decreased whereas the F_{IS} values decreased F_{IS} values. However, asexual genotypes did not share the same alleles among populations and thus genotypes increased the genetic differentiation among populations. Besides, our data confirmed the Glemin *et al*'s predictions (2001) : at 2cM, a neutral locus closely linked to the GSI's one presented evidences of hitchhiking. As the GSI locus, the neutral locus exhibited high heterozygote excess and low differentiation among populations.

The GSI constitutes an interesting tool to study the effect of the negative frequency dependent selection on genetic diversity and its structure. This kind of selection reduces the effect of the genetic drift and favours the allele mobility. However, the differentiation among population of wild cherry trees is intermediate. Our data validated the Schierup's predictions (1998). At an intermediate migration rate and contrary to the predictions of Wright model (1939), the S allele frequencies is dominated by low frequency alleles with large variance within demes. Low migration rate can maintain endemic specificities but is sufficiently high to propagate those specificities into other demes.

In the second part of the manuscript, we studied how genetic diversity passes from one generation to another under sexual reproductions. First, very few flowers were pollinated successfully and produced fruits. Moreover, individuals variably participated the next generation. Our results showed that asexual propagation did not disadvantage sexual reproduction. However, pollen limitation can be detected when the neighbourhood of an asexual genotype is principally constituted of its own ramets. Besides, we did not detect any effect of balanced selection into sexual reproduction. The mating systems and the probably

strong spatial structure cooperated to favour crosses between the closest neighbours. However, we observed a non-trivial quantity of progeny coming from long distance crosses. Our empirical data underlined the necessity to improve our knowledge on the impact of mixed mating systems have on evolutionary processes. Not only our results showed that their effects are more complicated and even opposite to theoretical predictions but also that the mating system can play a major force that drives the evolution of the genetic diversity of species.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux co-directrices de thèse : merci à Stéphanie Mariette de m'avoir recruté puis de m'avoir accompagné quotidiennement dans le monde de la recherche malgré une équipe spatialement aussi disséminée que son modèle d'étude (équipe et manips entre Nogent, Orsay, Orléans, Bordeaux, Madrid...et l'hôtel Marmottes à Laon, le QG de terrain de la « team »). Merci également de m'avoir soutenu dans mes idées et mes projets en me permettant financièrement et humainement de les mettre en place. Le chemin a parfois été tortueux (vive les marqueurs du GSI !) et la pente raide (mais pourquoi ces merisiers produisent des fleurs et des fruits si hauts ?!) mais les résultats et le jeu de données en valent vraiment la chandelle !

Merci à Nathalie Frascaria-Lacoste d'avoir accepté d'encadrer ma thèse et de m'avoir fait découvrir le fonctionnement d'un labo et d'une équipe, les feuillus précieux (la classe !) et de la recherche. Merci également d'avoir œuvré pour que cette thèse se déroule dans des conditions idéales.

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans la collaboration des membres de l'équipe de choc plus connue sous le nom de « team merisier », toujours présente dans le travail et la bonne humeur, que ce soit devant un énième gel des marqueurs du GSI illisible, ou perchée à 25 mètres du sol dans un merisier tanguant sous la brise. Merci donc à Emilie Balsemin, la Stagiaire-Pionnière de Stéphanie, à Sandrine Toussaint et à Jérôme Grange le Nomade. Merci particulièrement à Jérôme d'avoir accepté, pour mener à biens ces travaux, de se déplacer sans cesse entre Nogent, Orsay, Orléans,...et Bordeaux ;o).

Je remercie sincèrement tous les membres de mon jury, je suis heureux et fier de pouvoir leur présenter mes travaux de thèse et ravi que ces personnes, auteurs de travaux qui ont enrichi la vision que j'avais de mes données, montrent de la curiosité et de l'intérêt pour ma thèse. Merci à Markus Fischer et Jérôme Goudet de me faire l'honneur de juger mes travaux de thèse et de venir de si loin pour assister à la soutenance. Merci également à Sylvain Glémin et à François Lefèvre d'avoir accepté de prendre du temps pour lire ma thèse et de se déplacer si au Nord.

Je tiens à remercier chaleureusement les personnes qui m'ont permis grâce à leurs discussions de me faire progresser dans mes réflexions et de prendre du recul avec mes données. Merci donc à Jacqui Shykoff pour ses compétences, ses connaissances immenses et sa disponibilité malgré ses responsabilités administratives et scientifiques, je suis heureux d'avoir fait partie des membres de son laboratoire. Merci, sincèrement merci, à Juan Fernandez-M. : Que dire sans écrire tout un roman ? Merci pour tes compétences, ta disponibilité, ta bonne humeur et toutes les discussions que nous avons eues presque quotidiennement le midi et qui ont enrichi mes connaissances scientifiques. Merci également à Thierry Robert pour sa curiosité et son intérêt toujours enthousiaste à l'égard de mes travaux de thèse et à Christian Raquin pour les discussions scientifiques, son humanisme et ses visions de la recherche fortes d'enseignements. Merci à Olivier Panaud pour ses conseils avisés en salle manips et les discussions le midi.

J'ai pu bénéficier d'un rendez-vous annuel avec un comité de thèse. Les discussions passionnantes et les conseils prodigués à la suite de l'exposé de nos avancées et de nos idées m'ont apporté une autre vision de mes travaux et ont renouvelé chaque année ma motivation et mon enthousiasme, nécessaires pour avancer. Merci à Jacqui Shykoff, Sylvie Oddou,

Emmanuelle Porcher, Xavier Vekemans, Bart De Cuyper et Frédéric Austerlitz. Un merci particulier à François Goraud qui, venant d'autres thématiques de recherche, a su apporter une vision fraîche et pleine d'enseignements en participant activement.

Tous mes remerciements à Aboubakry Sarr, Thierry Robert, Bruno Toupance, Françoise Lamy, Jean-Pierre Henry qui m'ont permis de m'essayer à l'enseignement et de confirmer mon intérêt pour celui-ci.

Je tiens à remercier particulièrement mes voisins de bureau, Pierre Gérard, Mickael Blum, Carine Collin, Sylvain Billiard et toutes les personnes de passage dans le bureau, pour l'ambiance conviviale et pour avoir partagé les découvertes des avancées de nos travaux respectifs.

Merci aussi à Paola Bertolino, Odile Robin, Marie-Stanislas Remigereau, Fred, Marie-Elise Morand-Prieur, Roxana Yockteng, Naoko, Hélène Magalon, Clémentine Alline pour les discussions durant les longues heures de manip, les petits coups de main et l'ambiance studieuse et fraternelle.

Un grand merci à l'unité de recherche «Écosystèmes forestiers» du Cemagref de Nogent-sur-Vernisson pour m'avoir accueilli, m'avoir financé et avoir été présente malgré la distance due à mon affectation à Orsay. Merci à Bernard Abrial, Eric Collin, Isabelle Bilger, Christophe Bouget, Bernard Héois,... et toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à l'occasion de mes (trop) brefs passages ds le Loiret. Merci beaucoup à Josette Baptiste pour sa disponibilité et son aide dans les démarches administratives.

Merci aux membres du labo ESE d'Orsay. Merci à Laurent Penet, Clémentine Vitte, Sarah Triki-Teurtroy, Céline Devaud, Sandrine Pivard, Julie Sannier,...pour l'ambiance générale qui a régné tout au long de mes trois années et demi de thèse.

La SNCF (ligne TGV Tours-Massy) se joint à moi pour remercier le Cemagref et la Région Centre pour m'avoir financé durant ces 3 années. Enfin, je remercie de nouveau l'équipe l'unité de recherche «Écosystèmes forestiers» du Cemagref de Nogent-sur-Vernisson pour m'avoir financé ces 6 derniers mois.

Enfin, merci à mes parents qui m'ont permis d'arriver jusque là. Merci à ma femme et mon fils de m'avoir soutenu jour après jour dans l'avancée de ma thèse.



à ma plus belle expérience !

AVANT-PROPOS

Cette thèse présente une synthèse des travaux que j'ai effectués au laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, au sein du groupe d'Ecologie et Génétique des Populations d'Arbres Forestiers pour l'Unité de Recherches «Ecosystèmes Forestiers» du CEMAGREF de Nogent-sur-Vernisson. Depuis Octobre 2002, je me suis intéressé aux systèmes de reproduction des merisiers en conditions forestières et à leur impact sur la diversité génétique, sa structuration et le succès reproducteur mâle et femelle en population. Ce manuscrit regroupe les principaux résultats acquis au cours de ces 3,5 années de thèse. Une partie des données présentées sont en cours de valorisation via l'écriture d'articles scientifiques.

Ce travail de thèse repose sur l'acquisition d'un jeu de données particulièrement intéressant accumulé au long des 3,5 années de thèse par le groupe « merisier » (Jérôme Grange, Stéphanie Mariette et moi-même), les manipulations ayant été effectuées au CEMAGREF de Nogent-Sur-Vernisson (principalement pour les PCRs), au laboratoire d'Orsay (pour une partie des PCRs, les révélations sur gel d'agarose et sur gels au nitrate d'argent) ainsi qu'à l'INRA d'Orléans (pour le passage de la totalité des marqueurs microsatellites sur séquenceur capillaire). Cette acquisition de données a été enrichie par des stages et emplois satellites. Emilie Balsemin a particulièrement contribué à la mise au point des marqueurs microsatellites durant un stage préliminaire à ma thèse puis elle nous a aidés à l'acquisition des coordonnées GSP par satellites, financée par un contrat court au CEMAGREF. Sandrine Toussaint a participé à l'acquisition des données moléculaires microsatellites et aux données de terrain. Chloé Deygout et Thomas Bouyer ont grandement participé au développement du programme d'analyse de paternité intégrant l'information du GSI. Enfin, Camille Couteau en contrat court au CEMAGREF et Olivier Fouché en tant que responsable de l'antenne Région Centre des Accrobranchés nous ont aidés à atteindre les cimes de nos merisiers pour y compter les fleurs et les fruits et y observer les pollinisateurs.

Comme tout travail de recherche, ma thèse a été le fruit de collaborations spontanées ou par association dans un contrat financé. Ainsi, nous travaillons avec Xavier Vekemans et Vincent Castric de l'université de Lille pour étudier l'impact de la sélection balancée sur la mobilité des allèles S. Cette partie de la thèse développée Chapitre I, fait actuellement l'objet de la rédaction d'un papier. La rédaction de la discussion de celui-ci n'étant pas terminée, il n'a pas

été ajouté tel quel en annexe, seul les résultats sont présentés en Annexe 6. Nous avons par ailleurs travaillé avec l'INRA d'Orléans, le CGAF-ONF d'Orléans et l'ENGREF de l'Arboretum des Barres à l'étude des stratégies d'échantillonnage permettant de conserver les ressources génétiques d'arbres, ce projet étant financé par le Bureau des Ressources Génétiques. Cette collaboration a fait l'objet de la rédaction d'un manuscrit présenté Annexe 4 en 2004.

Suite à l'exposé de nos résultats concernant les succès de fructification des merisiers en fonction des stratégies de reproduction, Solenn LeCadre et Nathalie Machon m'ont proposé de participer à la rédaction d'une review sur les effets Allee chez les plantes. J'ai plus particulièrement contribué à la partie intitulée « Systèmes de reproduction et l'effet Allee ». Enfin, je travaille en collaboration avec Juan F. Fernández-Manjarrés et Pierre Gérard sur des aspects méthodologiques concernant l'efficacité des échantillonnages en populations pour estimer les Fis à des marqueurs microsatellites. Le manuscrit est presque terminé. Cependant, comme il n'a pas encore fait l'objet de relecture par des tiers, il n'est pas présenté en Annexe.

Deux biens sont pour nous aussi précieux que l'eau ou la lumière pour les arbres : la solitude et les échanges.

Christian Bobin

Introduction



"On ne va jamais aussi loin que
lorsqu'on ne sait pas où l'on va"

Christophe Colomb

INTRODUCTION

Diversité des systèmes de reproduction chez les plantes

Les systèmes de reproduction jouent un rôle fondamental dans la structuration spatiale et temporelle de la diversité génétique au sein et entre les populations d'une même espèce. Déterminant la migration efficace des allèles dans l'espace et dans le temps, ils constituent une des clés majeures pour comprendre la dynamique évolutive de la diversité génétique d'une espèce (Richards 1996 ; Barrett 2003). Les plantes génèrent des descendants via trois principaux modes de reproduction : l'allogamie, l'autofécondation et la propagation asexuée. Chez les végétaux, la plupart des individus peuvent utiliser couramment plusieurs de ces modes pour engendrer des descendants. Ils semblent adopter de façon stable dans l'espace et le temps des stratégies mixtes de reproduction (Richards 1996 ; Goodwillie *et al.* 2005).

D'un côté, la propagation asexuée confère une assurance de survie des génotypes, même si la production de tels descendants chez les espèces longévives et ligneuses peut se révéler plus coûteuse qu'une génération par voie sexuée (Bond & Midgley 2003). Elle n'implique pas d'évènements de recombinaison ou de méiose, ce qui conduit les génomes à se comporter comme des groupes de liaison géants (Richards 2003). Les combinaisons alléliques favorables émergées par mutation sont ainsi préservées. Mais en contrepartie, ces génotypes sont aussi sensibles à l'accumulation de mutations délétères (Muirhead & Lande 1997 ; *Muller's Ratchet* Richards 2003). Par ailleurs, la reproduction asexuée produit généralement des descendants qui sont moins aptes à la dispersion (Richards 2003). Il en résulte la création d'une structure spatiale forte où plusieurs générations du même génotype peuvent concourir pour l'accès aux mêmes ressources (Eckert 2001).

D'un autre côté, la distribution ubiquiste de la reproduction sexuée parmi tous les phyla eucaryotes témoigne de l'importance de ce mode de reproduction dans la capacité des organismes à se diversifier, à s'adapter et à évoluer. L'avantage de la reproduction sexuée consiste principalement dans sa capacité à créer rapidement de la diversité génétique par recombinaison sans avoir à attendre l'occurrence d'une mutation, et donc à « tester » à chaque génération un grand nombre de combinaisons (Maynard Smith 1978 ; Burt 2000) et à limiter l'accumulation d'allèles délétères (Agrawal 2001 ; Siller 2001 ; Paland & Lynch 2006). Cependant, elle a aussi pour effet théorique de détruire les associations alléliques favorables, parfois plus rapidement qu'elle ne peut les générer (Kondrashov 1993 ; Butlin 2002). De

manière générale, elle impose l'allocation de ressources à la création et la dispersion de gamètes mâles (Butlin 2002).

Au sein de la reproduction sexuée, la syngamie ou l'allogamie nécessite la présence et l'accessibilité de partenaire(s) compatible(s) pour générer des descendants. Or, chez les plantes, organismes stationnaires, l'allogamie implique l'emploi de vecteurs des gamètes mâles. La nécessité de confier la dispersion de leurs gamètes mâles à des agents externes à l'organisme a favorisé l'émergence d'une variété complexe de structures tant en taille qu'en forme pour assurer l'efficacité de la pollinisation. Par ailleurs, l'allogamie favorise le maintien d'une dépression de consanguinité forte (Lande & Schemske 1985 dans Goodwillie *et al.* 2005).

A l'inverse, au sein de la reproduction sexuée, l'autofécondation, par un effet rétroactif, favorise la purge des allèles délétères et aurait donc pour conséquence de maintenir une faible dépression de consanguinité dans les populations où celle-ci serait prédominante (Lande & Schemske 1985 dans Goodwillie *et al.* 2005). Par ailleurs, elle permet de limiter les coûts liés à la nécessité d'employer des vecteurs de pollen et de trouver au moins un partenaire compatible. Contrairement à l'allogamie, l'autofécondation confère l'assurance que les « coûts » liés à la production de gamètes et aux structures inhérentes à la reproduction sexuée soient « rentabilisés » (Barrett 2002 ; Goodwillie *et al.* 2005).

Cadre de la thèse: étude d'une espèce combinant reproduction partiellement asexuée et système d'auto incompatibilité gamétophytique

La propagation asexuée

Chez les plantes, la reproduction asexuée consiste à produire une nouvelle plante (ramet) par division mitotique, sans méiose ou fusion de gamètes. Plusieurs termes sont couramment employés pour citer la capacité des plantes à se propager végétativement. Richards (2003) la nomme apomixie (capacité à se reproduire sans fécondation) ce qui englobe l'agamospermie, c'est-à-dire la capacité de produire des graines sans fécondation. Eckert (2001) et Honnay & Bossuyt (2005) l'appellent propagation ou reproduction clonale que l'individu produit soit ou non autonome de son géniteur. L'une des méthodes (*sprouting*) particulièrement employée par les espèces ligneuses consiste à générer une nouvelle plante à partir d'une repousse racine (Bond & Midgley 2003). Parmi les quatre types de repousses racinaires habituellement identifiées (repousse de souche *collar sprout*, loupe ou broussin *lignotuber* et rhizome, marcotte *layering sprout* et drageon *suckering root*), le drageonnage consiste pour une espèce

ligneuse à produire une nouvelle tige ou un nouveau tronc à partir des tissus racinaires (Del Tredici 2001). Cette forme de propagation asexuée serait mise en place en réponse à un stress, une perturbation environnementale modifiant la dominance apicale (Desrocher & Lieffers 2001) ou une lésion du système racinaire (Del Tredici 2001 ; Bond & Midgley 2003). Quel que soit le mécanisme sous-jacent à la propagation végétative non-agamospermiq ue chez les végétaux, les conséquences démographique et génétique restent les mêmes, celles inhérentes à la production de clones. Cependant, la notion de clones chez les plantes peut différer sensiblement de celle communément admise pour les animaux. Elle n'implique pas que les clones (ramets) produits possèdent des mécanismes de dispersion efficace, ce qui conduit à une certaine agrégation spatiale des ramets (Richards 2003). Par ailleurs, ces « clones » peuvent rester physiologiquement dépendants de la plante primaire (Del Tredici 2001). Néanmoins, ces ramets constituent bien des répétitions d'un même génotype (genet) et ont la capacité de survivre à plusieurs générations d'individus ne se reproduisant que par voie sexuée (Bond & Midgley 2003 ; Richards 2003).

Le système d'auto incompatibilité gamétophytique

“The inability of fertile hermaphrodite seed plants to produce zygotes after self-fertilization”
(De Nettancourt 2001).

Chez les plantes, l'auto incompatibilité (SI) est un mécanisme prézygotique qui permet de dresser une barrière reproductive entre un ovule et du pollen qui lui serait apparenté (De Nettancourt 2001). Chaque plante appartient à un ou plusieurs types sexuels qui ne peuvent former de zygote qu'avec des gamètes ou des individus portant un type sexuel différent. On distingue habituellement deux grand types de système d'auto incompatibilité : les systèmes hétéromorphiques et les systèmes homomorphiques. Chez les plantes à SI hétéromorphiques, chaque individu développe un des deux ou trois morphes que comporte l'espèce (généralement dénommé long-, moyen- et court-stylé). Les croisements entre individus portant le même morphe sont infertiles (Barrett 2002). Les espèces dont la reproduction sexuée est contrôlée par un SI homomorphique comportent généralement beaucoup plus de types sexuels. Chez les SI sporophytiques, le phénotype du pollen est déterminé par le génotype complet du parent. Les grains de pollen portant au moins un allèle commun avec la plante-mère restent à la surface des styles, incapables de produire des tubes polliniques.

Chez les SI gamétophytiques, le phénotype du pollen est déterminé par l'allèle haploïde du gamète. Si le grain de pollen porte un allèle différent de la mère, la fécondation peut se faire. Le système d'auto incompatibilité gamétophytique (GSI) existe sous la forme d'au moins

trois mécanismes cellulaires distincts (Franklin-Tong & Franklin 2003a). Quelles que soient les voies physiologiques incriminées, le macro fonctionnement de ce SI reste le même : un locus S regroupe au moins deux gènes très fortement liés codant pour un déterminant pollinique et une S protéine stigmatique. Le pollen ne produit qu'un phénotype sexuel, celui exprimé par son génotype haploïde. Lorsque le grain de pollen est déposé sur le style, celui-ci germe et développe un tube pollinique. C'est seulement dans le style que les mécanismes de reconnaissance cellulaire se produisent. La progression du tube pollinique est alors bloquée par une cascade de signaux cellulaires qui aboutissent à l'inhibition du métabolisme des cellules polliniques. Finalement, les cellules du style sécrètent un bouchon de callose qui empêche définitivement la progression physique du tube pollinique vers l'ovaire. Le mécanisme impliquant l'utilisation de S-RNase semble commun à l'ensemble des familles des Eudicotylédones centrales : les cellules du style sécrètent des S-glycoprotéines capables de pénétrer les cellules du grains de pollen. Comme leur domaine catalytique présente de fortes homologues de séquences avec des RNases de champignons, ces cytotoxines S-allèles spécifiques ont été nommée S-RNases. Lorsqu'un grain de pollen porte un allèle S commun avec ceux des cellules du style, les S-RNases s'apparient avec les déterminants polliniques codés par l'allèle S du pollen. Les complexes ainsi formés permettent aux S-RNases d'échapper à l'inactivation de leur site catalytique par les protéines S-RNases inhibitrices présentes dans le cytoplasme des cellules polliniques. Appariées aux déterminants polliniques codés par le même allèle S, elles conservent leur activité de dégradation des ARN ribosomiaux et bloquent ainsi toute activité métabolique chez les cellules polliniques (Franklin-Tong & Franklin 2003b).

Occurrence des espèces combinant propagation asexuée et SI

Deux tiers des plantes de la flore européenne auraient la capacité facultative de produire des individus identiques et indépendants à partir de mitoses (Honnay & Bossuyt 2005). Richards (2003) estime pour sa part que 60% de la flore britannique se propagerait en partie par voie asexuée. D'après Del Tredici (2001), tous les arbres des régions tempérées auraient la capacité de produire des troncs secondaires avant leur maturité par repousse (*sprouting*) et beaucoup d'entre eux la conserveraient à l'âge adulte. Ainsi, dans une revue bibliographique, parmi 68 espèces d'arbres nord-américaines, il identifie que toutes sont capables de produire des repousses racinaires en tant que plantule, 84% des espèces (toutes les Angiospermes et 2 conifères) conservent cette capacité jusqu'à leur maturité sexuelle et 41% tout au long de leur vie d'adulte. 25% des espèces (soit 17 espèces sur 68) se montrent capable de drageonner tout

au long de leur vie (Del Tredici 2001). Ainsi, de nombreuses espèces de plantes seraient donc capables de se propager par voie asexuée en population. Pourtant, malgré l'importance économique, trophique, culturelle ou ornementale de ces espèces pour l'Homme, la littérature scientifique actuelle manque d'informations sur l'occurrence effective et la quantification de la reproduction asexuée en population (Richards 2003 ; problème identique chez les animaux voir Mark Welch dans Butlin 2002). Historiquement, la gestion traditionnelle des forêts notamment en taillis ou taillis sous futaie a favorisé cette communauté à prendre en compte l'importance de la reproduction asexuée en population (Honnay & Bossuyt 2005). Cependant, depuis le travail de Wells (1969 dans Honnay & Bossuyt 2005), l'intérêt pour la compréhension des mécanismes évolutifs permettant le maintien de la reproduction asexuée chez les ligneux s'est principalement focalisé sur son avantage dans les milieux périodiquement perturbés (Del Tredici 2001). Peu de données sont donc disponibles sur l'occurrence et l'influence de ce mode de reproduction sur le fonctionnement des espèces.

Plus de 50 % des familles d'Angiospermes présenteraient un système d'auto-incompatibilité homomorphe (De Nettancourt 2001). Le système d'auto-incompatibilité gamétophytique (GSI) est considéré comme le système le plus répandu chez les plantes : on estime qu'il serait présent chez près de 60 familles d'Angiospermes (Eudicotylédones et Monocotylédones). A l'heure actuelle, nous disposons des preuves moléculaires ou physiologiques qu'au moins une espèce dans chacune des 6 familles suivantes (Rosaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Campanulaceae, Papaveraceae et Poaceae) présente un GSI.

Toutes ces familles comportent des espèces capables de se propager par voie asexuée. Pourtant, il est aujourd'hui impossible de quantifier clairement quelles espèces et combien utilisent de façon mixte un système de reproduction asexuée par repousse et un système de reproduction sexuée contrôlé par un GSI. Cependant, Spencer C.H. Barrett (*com. pers.*) considère que ce système de reproduction mixte doit être extrêmement courant chez les plantes : *“The list of species that reproduce both asexually via clonal propagation and that are also SI is huge. After all it has been estimated that at least 50% of the flowering plants have SI systems and that most are perennial with some form of asexual reproduction. Hence the association between these conditions is certainly not uncommon, it may involve the majority of flowering plants.”*

Propagation partiellement asexuée combinée à un GSI : un « paradoxe » évolutif ?

L'emploi de la reproduction asexuée défavoriserait la reproduction sexuée des espèces à GSI. En effet, la reproduction asexuée diminue la diversité génotypique (Balloux *et al.* 2003) et

pourrait être à l'origine de réduction de taille efficace (Orive 1993). Or, lorsqu'une population d'une espèce auto-incompatible subit des réductions de sa taille efficace, le manque d'allèles compatibles peut limiter voire bloquer la reproduction sexuée (Byers & Meagher 1992 ; Vekemans *et al.* 1998). Par ailleurs, chez les plantes, la reproduction asexuée non agamosperme s'accompagne le plus souvent de la mise en place d'une forte structure spatiale. Cette structuration spatiale et la multiplication locale du nombre de fleurs d'un même genet peut augmenter la proportion de pollen géitonogame (Klinkhamer & De Jong 1997) infertile chez les espèces à GSI et aboutir à une diminution de l'efficacité de la reproduction sexuée. Les effets paradoxaux de la combinaison reproduction partiellement asexuée et reproduction sexuée contrôlée par un système d'auto-incompatibilité seraient à l'origine des faibles fructifications, voire de la disparition de la reproduction sexuée, observées chez certaines espèces (Aspinwall & Christian 1992 ; Dorken & Eckert 2001 ; Wang *et al.* 2005). Ainsi, lorsque la reproduction sexuée deviendrait rare, comparée à la reproduction asexuée, elle produirait des descendants peu recombinants et moins bien adaptés. De fait, on s'attend à observer une tendance de « fuite en avant » qui aboutirait évolutivement à la perte de la fonction sexuée (*runway* ou *doomsday scenario* Peck & Waxman 2000; Richards 2003). Cependant, d'après Bengtsson & Ceplitis (2000), une reproduction mixte pourrait persister d'une façon évolutivement stable si les avantages relatifs de la propagation asexuée et de la reproduction sexuée varient selon les années.

Questionnement scientifique de la thèse

Ces effets potentiellement paradoxaux de la reproduction asexuée et de la reproduction sexuée sous contrôle du GSI et leurs conséquences potentiellement fortes sur l'évolution des espèces témoignent de la nécessité de mieux comprendre le fonctionnement et l'impact des systèmes de reproduction mixte chez les plantes.

Ce travail de recherche a pour but de participer à l'étude de l'évolution du système de reproduction chez les plantes. Il consiste à mieux comprendre les implications évolutives de l'utilisation de système de reproduction mixte chez les plantes combinant à la fois un mode de propagation asexuée facultative et une reproduction sexuée où les croisements se font sous le contrôle d'un système d'auto-incompatibilité. Ce manuscrit de thèse est donc formé de deux parties qui consistent :

- d'une part, à analyser quels peuvent être les effets d'un système de reproduction combinant à la fois une reproduction partiellement asexuée et une reproduction sexuée

sous contrôle d'un GSI sur l'état et la structuration de la diversité génétique d'une angiosperme entomophile longévive.

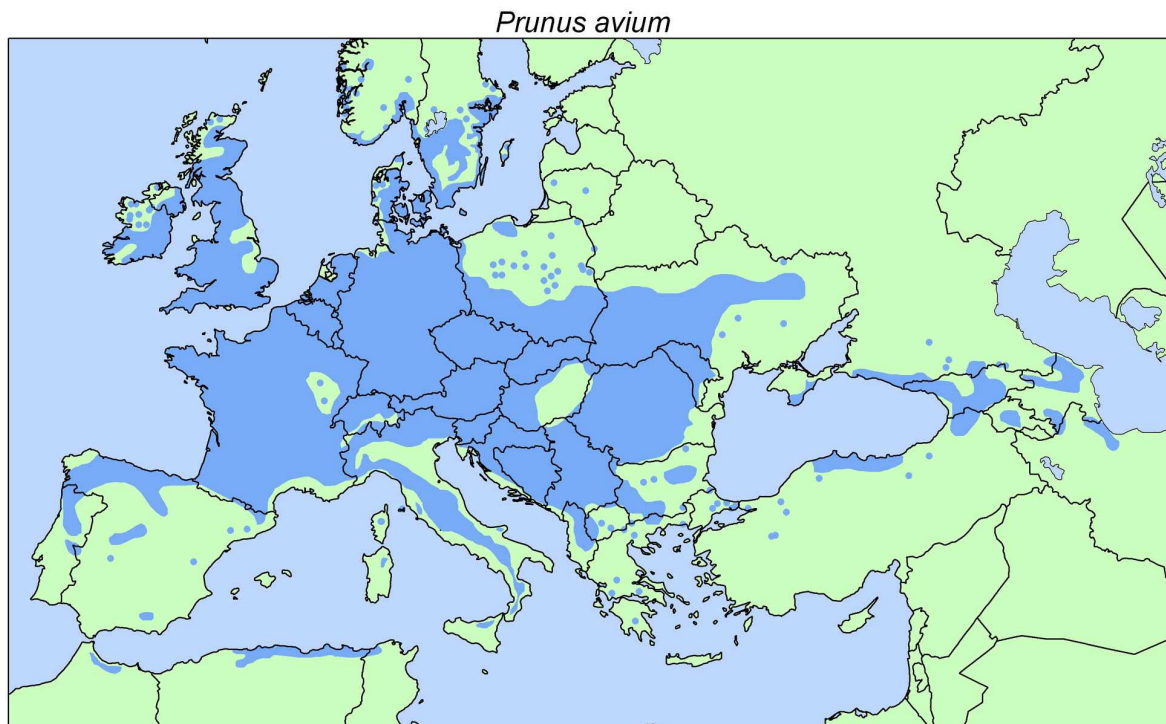
- et d'autre part, à étudier comment cette diversité génétique se transmet dans le temps par voie sexuée en estimant les participations individuelles d'une population adulte à la création de la génération suivante.

Pour ce faire, nous avons choisi comme modèle d'étude le merisier (*Prunus avium* L.), une espèce forestière disséminée de la famille des Rosacées. Cette espèce présente l'avantage de combiner en population un système de reproduction sexuée contrôlé par un système d'auto-incompatibilité gamétophytique et la capacité de se propager par voie asexuée en drageonnant. Par ailleurs, l'intensité de l'utilisation de la propagation asexuée et les fréquences des allèles S varient d'un génotype à l'autre au sein d'une même population. De fait, elle constitue un modèle de choix pour relier l'intensité de l'utilisation de la reproduction asexuée et les succès reproducteurs des individus. De plus, cette espèce a été choisie au niveau français comme espèce modèle pour la conservation des essences forestières entomophiles disséminées, elle constitue donc un modèle de choix pour discuter des méthodes de conservation et du possible impact des activités anthropiques sur la diversité génétique et le devenir des essences forestières entomophiles disséminées. Cette espèce est longévive, elle permet donc un suivi des individus dans le temps, la répétition temporelle des manipulations tout en conservant la même répétition spatiale et la même structuration des classes d'âge de la population. Cette espèce est disséminée et entomophile ce qui renforce l'importance des choix individuels des stratégies de reproduction mises en place sur les modalités de la transmission temporelle de la diversité génétique d'une génération à l'autre. Enfin, cette espèce présente un intérêt économique pour l'Homme : elle est exploitée en sylviculture pour son bois de qualité, en arboriculture pour ses fruits, en horticulture pour sa capacité de porte-greffe des variétés de *Prunus* ornementaux ou encore comme essence favorable au développement et à la fixation de « gibiers ». Par ailleurs, au-delà de son utilisation pragmatique et économique pour l'Homme, cette espèce est porteuse de valeurs culturelles et patrimoniales fortes dans de nombreux pays d'Europe.

Caractéristiques de l'espèce étudiée : *Prunus avium* L.

Le merisier, *Prunus avium* L. (*wild cherry tree*), est un arbre des régions tempérées de la famille des Rosaceae. C'est une essence disséminée qui se trouve le plus souvent sous la forme de petits peuplements poussant en bouquets de 10 à 200 arbres au sein de forêt constituée principalement d'autres essences dites sociales (chênes, hêtre,...). Il se reconnaît

Figure 1 : Aire de distribution « naturelle » des merisiers en Europe.



This distribution map was compiled by members of the EUFORGEN Noble Hardwoods Network based on an earlier map published by Schütt 1995 and published in <http://www.seba.ethz.ch/pdfs/ki.pdf> and the map available at <http://linnaeus.nrm.se/flora/di/rosa/prunul/prunavi.html> and was published in:
Russell K.. 2003. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for wild cherry (*Prunus avium*).
International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 pages.

Source : Russel 2003.

par son écorce lenticellée et ses feuilles ovales à longs pétioles portant deux glandes nectarifères. Cette espèce moyennement héliophile et opportuniste s'adapte à de nombreux sols : elle est considérée comme une espèce post-pionnière dont les individus peuvent vivre jusqu'à 100 ans environ.

Chaque année, en Avril, il se couvre de fleurs blanches hermaphrodites et entomophiles (symétrie radiaire avec 5 pétales) à long pédoncule dont les anthères produisent du pollen lourd et collant. Il est souvent le premier arbre entomophile forestier à se couvrir de fleurs et son pollen riche en acides aminés constitue une ressource indispensable au développement de nombreux insectes et particulièrement pour les hyménoptères sociaux de type abeilles ou bourdons qui doivent repeupler leur colonie à la sortie de l'hiver (Pesson & Louveaux 1984). Le merisier produit des drupes zoochores (fruit à sarcocarpe charnu comestible et à sclérocarme lignifié issu de la fécondation d'un ovaire à carpelle unique).

Cette espèce est diploïde et présente 8 groupes de liaison (Aranzana *et al.* 2003 ; Dirlewanger *et al.* 2004). Elle aurait donné naissance à l'espèce *Prunus cerasus* (le cerisier acide, $2n=4x=32$) en s'hybridant avec *Prunus fruticosa* et pourrait s'hybrider de nouveau en population avec *Prunus cerasus* pour donner des descendants *Prunus gondouinii* ($2n=4x=32$) (Tavaud *et al.* 2004).

Largement présente dans toute l'Europe (Figure 1), elle serait originaire d'Asie mineure. Les premières traces écrites de la présence de l'arbre en tant que fruitier remonterait à Lucullus, (naissance -115, décès -45 avant JC), un général romain parti en -71 conquérir le Pont-Euxin au Roi Mithridate VI, qui aurait ramené des variétés fruitières comme trophées. Cependant, le merisier était probablement présent dans les forêts occidentales bien avant que les variétés fruitières ne soient mentionnées dans les écrits. Une partie de l'espèce subit un processus de domestication et de sélection dirigées à des fins culinaires et ornementales depuis probablement le premier millénaire avant JC (Tavaud 2002). Ainsi, le merisier « forestier » serait à l'origine des variétés domestiques de cerises douces (Bigarreux à chair ferme et guignes à chair molle voir Tavaud 2002) massivement cultivées en France (3^{ème} position, après l'Allemagne et l'Italie, avec une production annuelle estimée en à 100 000 t sur 20 000 ha ; Pesson & Louveaux 1984). Par ailleurs, l'espèce est couramment utilisée en sylviculture depuis plus de 30 ans et on estime que 1 à 1,5 millions de plants rejoignent les forêts françaises chaque année (Bilger dans Tessier du Cros 1999).

Intérêt de l'étude du système de reproduction pour la mise en place d'une stratégie de conservation des ressources génétiques sur *Prunus avium* L.

Contexte international et national pour la conservation des ressources génétiques des espèces forestières

Les préoccupations économiques et politiques impulsées par les avancées scientifiques et sociales ont conduit la plupart des nations à considérer la biodiversité comme une ressource « naturelle » nécessaire aux développements humains. La France a mis en place une politique de conservation des ressources génétiques des arbres forestiers dès le début des années 1990 (circulaire DERF/SDF/N91/N°3011 du 9 septembre 1991), qui s'est révélée en accord avec les engagements européens (Strasbourg, 1990, Helsinki, 1993) et mondiaux (conférence de Rio, 1992). Des réseaux de conservation ont été mis en place ainsi qu'un suivi scientifique « s'attachant à faire progresser les connaissances sur l'amplitude et la structuration de la variabilité génétique [...] d'espèces représentatives des différents modèles de reproduction et de colonisation de l'espace » et « précisera les effets des facteurs [environnementaux susceptibles d'agir] sur l'évolution de la diversité génétique » (Charte pour la conservation des ressources génétiques des arbres forestiers en France, BRG, 1997). En effet, pour que la conservation des ressources génétiques d'une espèce soit efficace au moment de sa mise en œuvre et à long terme, elle nécessite au préalable de comprendre comment la variabilité génétique de l'espèce se structure dans l'espace, comment elle se transmet au fil des générations mais aussi quels sont les facteurs susceptibles d'influencer son évolution (Dickinson *et al.* 2003).

Pourquoi conserver les ressources génétiques du merisier ?

Par un processus de domestication sur une échelle de plusieurs siècles, l'homme a créé un compartiment fruitier cultivé. Les vergers fruitiers peuvent se trouver à proximité de forêts, compartiments «sauvage» et fruitier sont donc susceptibles d'échanger des gènes. L'influence à long terme du compartiment fruitier sur le compartiment sauvage reste ainsi à déterminer, par exemple dans les régions de déprise agricole où des vergers retournent à l'état «sauvage». Par ailleurs, les sylviculteurs ont commencé à utiliser le merisier en essence de reboisement dans les années 1970. Le matériel génétique utilisé pouvait alors aussi bien provenir du *Prunus avium* forestier ou du *Prunus avium* fruitier (distillerie, confiture) ou même du *Prunus cerasus* (qui serait le résultat de croisements entre *P. avium* et *P. fruticosa*). Pour fournir du matériel végétal adapté aux reboiseurs, un programme d'amélioration a été mis en place dès 1978 par l'INRA à partir de la sélection phénotypique «d'arbres-plus» en forêt. Ce

programme d'amélioration a permis de sélectionner des clones, qui sont aujourd'hui commercialisés (matériel issu de multiplication végétative). Il est également envisagé de commercialiser des plants issus de reproduction sexuée dans les vergers à graines de clones. Enfin, depuis 1989, le merisier est soumis à la réglementation et les plants commercialisés ne doivent maintenant provenir, outre des clones du programme d'amélioration, que de graines récoltées sur des peuplements classés. Néanmoins, l'administration a toutefois la possibilité, les années de pénurie, d'autoriser en dérogation l'utilisation de graines récoltées sur d'autres peuplements que les peuplements classés. Au cours des trente dernières années, l'origine et la base génétique du matériel utilisé en reboisement reste donc inconnue, de même que son impact potentiel sur le compartiment «sauvage».

Stratégie de mise en place du réseau de conservation chez le merisier : *in situ* et/ou *ex situ*

La circulaire DERF/SDF/N°91/3011 du 9 septembre 1991 rappelle que «la conférence de Strasbourg de 1990 a recommandé que les populations d'arbres soient conservées de préférence en place dans leur milieu naturel («dynamique» et «*in situ*») [...] cette option n'exclut nullement des actions de conservation «*ex situ*», chaque fois que nécessaire, et notamment pour ce qui concerne les espèces disséminées (merisier)». A la suite de cette circulaire, la stratégie de conservation proposée pour le merisier a été définie en fonction de la densité observée d'individus : *ex situ* quand les densités sont faibles et *in situ* dans le cas contraire. D'un point de vue théorique, cette stratégie est justifiée par le fait que le nombre d'individus contribuant à la génération suivante (que l'on peut estimer via la taille efficace de population) est un paramètre déterminant pour l'évolution d'une population : la dérive génétique, et la perte de diversité qu'elle peut entraîner, est beaucoup plus forte dans une population de taille réduite.

A la suite de ces recommandations, des plantations *ex situ* ont été installées en Bretagne et Midi-Pyrénées. De plus, dans le but d'établir un programme d'amélioration sur l'espèce, un échantillonnage de merisiers a été pratiqué par l'INRA d'Orléans sur la base de sélection d'arbres plus en forêt. Le test de la représentativité de cette collection par rapport aux populations naturelles de merisier est en cours (Annexe 4). La question de la mise en place d'un réseau *in situ* reste posée, un ensemble de populations a été proposé (Annexe 4). Pour cela, et comme précisé précédemment, des connaissances minimales sur la structuration génétique de l'espèce sont nécessaires.

L'étude des stratégies mixtes de reproduction du merisier en population entrepris dans le cadre de cette thèse vise donc aussi à apporter des réponses quant à la mise en place effective d'un réseau de conservation in situ dont l'objectif consiste à sauvegarder la variabilité génétique de *Prunus avium* de l'impact des activités anthropiques et des potentiels changements globaux.

L'objectif de cette thèse consiste donc d'une part à mieux comprendre comment l'utilisation de systèmes de reproduction mixte combinant à la fois une propagation partiellement asexuée et une reproduction sexuée sous contrôle d'un GSI influe sur la diversité génétique observable à des marqueurs microsatellites et sur son évolution dans le temps et, d'autre part, à acquérir une meilleure compréhension du fonctionnement de l'espèce *Prunus avium* L. en population forestière dans le but de proposer des recommandations pour la mise en place et le suivi d'un réseau de conservation visant à protéger ses ressources génétiques. Ce manuscrit de thèse s'organise en 3 parties.

Une première partie (chapitre I) s'attachera à caractériser la structuration de la diversité génétique intra-populationnelle au niveau de 8 marqueurs microsatellites et du locus du GSI. à étudier la différenciation génétique de 3 populations de merisiers géographiquement distantes, ainsi que l'impact de la différenciation génétique sur les fréquences alléliques d'un locus sous sélection balancée : le locus du GSI.

Une deuxième partie (chapitre II) consistera à l'étude de la transmission de la diversité génétique d'une génération à l'autre par voie sexuée dans une population forestière de merisier. Nous regarderons comment les systèmes de reproduction influent sur les composantes femelles et mâles des succès reproducteurs individuels en fonction des conditions environnementales, des situations spatiales et des caractéristiques phénotypiques individuelles.

Enfin, dans une troisième partie (chapitre III), les connaissances accumulées sur le fonctionnement du merisier permettront de discuter de la conservation des ressources génétiques du merisier et de la mise en place et du suivi d'un réseau de conservation in situ sur le territoire français.

Chapitre I



Sphinx drupiferarum, le sphinx du merisier.

CHAPITRE I : GENETIQUE DES POPULATIONS D'UNE ESPECE POURVUE D'UN SYSTEME DE REPRODUCTION EXOTIQUE : TEST DES PREDICTIONS THEORIQUES PAR VOIE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

La génétique des populations consiste à s'intéresser à l'évolution des fréquences alléliques sous l'effet de la mutation, de la dérive, de la migration et de la sélection génétique. Une voie de modélisation particulièrement explorée au cours du dernier siècle consiste à prendre en compte le fonctionnement des espèces en populations structurées et à reporter la structuration de la diversité génétique à l'aide de F-statistiques qui décrivent comment les variations génétiques sont hiérarchisées à l'intérieur des populations et entre populations (Wright 1921, 1969). Par ailleurs, les F-statistiques constituent des outils robustes et intéressants pour interpréter des données issues de populations « naturelles » (Weir & Cockerham 1984 ; Neigel 2002). Ces modèles initiaux peuvent être adaptés pour mieux comprendre comment certains systèmes de reproduction, dits « exotiques » malgré leur existence chez de nombreuses espèces, influent sur la structuration et l'évolution de la diversité génétique des populations. La récente démocratisation des marqueurs moléculaires permet l'examen approfondi des structures génétiques. Parmi leurs utilisations possibles, les marqueurs tels que les microsatellites, en raison de leurs caractéristiques (neutralité, hyper variabilité et co-dominance), se révèlent être des outils de choix pour identifier la structure génétique d'une espèce et pour confronter les prédictions des modèles théoriques à la réalité biologique.

Cette partie sera consacrée à l'étude de la structure génétique des populations de merisiers sous l'influence d'un système de reproduction mixte combinant une propagation partiellement asexuée et une reproduction sexuée contrôlée par un GSI. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'organisation de la diversité génétique intra-populationnelle telle que décrite par les F_{IS} et aux causes possibles des excès d'hétérozygotes que nous avons observés. Dans un second temps, nous étudierons la structure de la diversité génétique des merisiers entre populations telle que décrite par les F_{ST} . Enfin, nous nous intéresserons à l'effet de la structuration entre populations sur le fonctionnement d'un locus sous sélection fréquence-dépendante négative, le GSI, et plus particulièrement sur la distribution de ses fréquences alléliques en population.

I). PREDICTIONS THEORIQUES DE L'IMPACT DE LA CLONALITE ET DU GSI SUR LES VALEURS DES F-STATISTIQUES

Même si beaucoup de plantes utilisent couramment des stratégies mixtes de reproduction, il existe étonnamment peu de modèles prédisant les effets attendus de tels systèmes de reproduction sur la structuration génétique des populations. Nous nous sommes donc intéressés aux prédictions des influences indépendantes de la reproduction partiellement asexuée et du GSI sur la structure génétique intra- et inter-populations.

A). Prédications concernant l'indice de fixation intra-population: F_{IS}

Parmi les indices de fixation de Wright, le F_{IS} exprime un excès, quand il est négatif, ou un déficit en hétérozygotes, quand il est positif, par rapport aux attendus sous les hypothèses d'Hardy-Weinberg.

1). Effet de la clonalité sur la diversité génétique intra-populationnelle et sur sa structuration

A chaque génération, la reproduction sexuée impose une profonde restructuration du génome. Les événements de recombinaison liés à la méiose éliminent les éventuelles liaisons entre allèles de loci différents. A l'inverse, les individus générés par la propagation asexuée sont identiques à leur parent et ont peu de chance d'avoir subi des réorganisations génétiques. De fait, en limitant les réorganisations génomiques, la propagation asexuée défavorise la diversité génotypique. Une deuxième conséquence inhérente à la propagation asexuée est que les génotypes persistent au cours des générations. Ils subissent donc peu les effets de la dérive même si celle-ci persiste mais sous une forme inhabituelle et avec une probabilité d'occurrence beaucoup plus restreinte : des allèles peuvent être perdus si et seulement si toutes les copies d'un allèle appartiennent à un ou des génotypes n'ayant pu produire de descendants avant leur extinction. Enfin, une population se reproduisant par voie asexuée s'affranchit de la création d'homozygotes à partir de gènes parentaux à l'état hétérozygote. En figeant dans l'espace et dans le temps la diversité allélique et les liaisons entre allèles de loci différents, la reproduction asexuée limite la diversité génotypique, limite la perte d'allèles et maintient l'hétérozygotie.

Plus encore, à l'échelle des populations, la reproduction asexuée peut augmenter la diversité allélique et être à l'origine d'excès d'hétérozygotes (Judson & Normark 1996). En effet, les génotypes qui se reproduisent par voie asexuée persistent sur de grandes plages temporaires,

survivant à plusieurs générations sexuées (DesRochers & Lieffers 2001). A ce titre, ils ont une plus forte probabilité de subir des événements de sélection tant en quantité qu'en intensité. Si la sélection favorise en moyenne plus souvent les loci à l'état hétérozygote (David 1998; Hansson & Westerberg 2002), elle devrait favoriser l'hétérozygotie chez les lignées à reproduction asexuée. Chez les ligneux longévifs, des observations de terrain réalisées chez quelques espèces ont largement contribué à diffuser cette idée chez les personnes qui travaillent sur les arbres (*Pinus sp.* Bush & Smouse 1991 ; *Quercus chrysolepis* Montalvo *et al.* 1997). Ainsi, l'association entre sélection globale plus favorable aux loci à l'état hétérozygote (Bush & Smouse 1991) et déséquilibres de liaison caractéristiques de la reproduction asexuée (Halkett *et al.* 2005) créerait un effet de superdominance associative à l'échelle du génome complet et augmenterait par entraînement l'hétérozygotie globale chez ces espèces (voir discussion Ducci & Santi 1997 ; Montalvo *et al.* 1997). Par ailleurs, le fait que les génotypes asexués persistent dans le temps peut être à l'origine de la création de diversité allélique (Halkett *et al.* 2005). Ainsi, deux copies d'allèles d'un même locus au sein d'un même individu diploïde peuvent accumuler au cours du temps des mutations de façon indépendante qui, progressivement, les font diverger (Birky 1996 ; Welch & Meselson 2000). Ce phénomène identifié sous le terme d'effet Meselson peut conduire d'anciennes lignées clonales à apparaître strictement hétérozygotes à tous leurs loci (Welch *et al.* 2004).

Cependant, deux études théoriques étudiant l'impact de la reproduction asexuée sur la diversité génétique intra-populationnelle ont montré que si l'on néglige la divergence des allèles par mutation (effet Meselson), un très faible nombre d'événements de reproduction sexuée suffit à limiter voire occulter les effets attendus sous propagation asexuée stricte (Bengtsson 2003 ; Balloux *et al.* 2003). Les populations dont le taux de reproduction asexuée ne dépasse pas 90% ou qui introduisent plus d'une reproduction toutes les trois générations clonales (Bengtsson 2003) devraient avoir des valeurs de F_{IS} proches ou identiques de celles obtenues dans des populations se reproduisant uniquement par voie sexuée.

Ainsi, chez les pucerons *Rhopalosiphum padi*, les lignées parthénogénétiques strictes affichent des valeurs de F_{IS} significativement négatives tandis que les lignées sexuées présentent des valeurs significativement positives (Delmotte *et al.* 2002) et chez *Quercus chrysolepis*, le nombre de ramets par genet est significativement corrélé aux nombre de loci à l'état hétérozygote (Montalvo *et al.* 1997).

Pour ce qui est de l'effet de la propagation asexuée sur la diversité génétique intra-populationnelle et sur sa structuration, les attendus sont donc les suivants : d'une part

on attend un taux d'hétérozygotie supérieur chez les génotypes se propageant par voie asexuée, d'autre part, à l'échelle de la population, on attend des F_{IS} significativement négatifs uniquement si le taux de reproduction asexuée est supérieur à 90%.

2). Effet du GSI sur la diversité génétique intra-populationnelle et sur sa structuration

L'effet du GSI sur la diversité génétique et sa structuration a principalement été étudié de façon théorique. Il existe actuellement peu de jeux de données moléculaires concernant les GSI (Castric & Vekemans 2004). De plus, les résultats empiriques tels qu'ils sont présentés ne permettent pas de savoir si les données empiriques confirment les attendus théoriques.

D'après Hartl & Clark (1997), on attend qu'un locus de type GSI augmente, par effet d'entraînement, l'hétérozygotie de tous les loci du génome, que ceux-ci y soient liés ou non. Balloux (2004) apporte une précision nécessaire à cet attendu qui permet de mieux comprendre l'effet possible des loci impliqués dans le GSI sur le génome dans sa globalité. Lorsque la taille des populations est faible, le fait que chaque individu ne puisse pas se reproduire avec lui-même soustrait une proportion d'autant plus importante d'homozygotes par rapport aux attendus sous les hypothèses d'Hardy-Weinberg que la taille de la population participant à la reproduction est faible. De fait, quand la taille efficace de reproduction des populations est suffisamment grande (supérieure à 25 individus ou plus de 4 allèles d'auto-incompatibilité dans la population de reproducteur, Glémin *et al.* 2001), l'effet d'entraînement du GSI n'est attendu que sur des loci très fortement liés aux loci impliqués dans ce mécanisme (Glémin *et al.* 2001).

Pour ce qui est de l'effet du GSI sur la diversité génétique intra-populationnelle et sur sa structuration, nous nous attendons donc à observer un excès d'hétérozygotes au locus du système d'auto incompatibilité gamétophytique et à des locus liés, quelle que soit la taille de la population considérée. L'effet pourrait s'étendre à des locus plus éloignés dans le cas où les tailles de population seraient « petites ».

B). Prédiction concernant l'indice de fixation inter-populations: F_{ST}

Parmi les indices de fixation de Wright, le F_{ST} permet de mesurer la variance des fréquences alléliques entre dèmes d'une population structurée. Plus cet index de différenciation est proche de zéro, moins les fréquences alléliques entre dèmes sont différentes. Par ailleurs, dans le cas d'un modèle en îles avec un nombre infini de dèmes de taille constante, cet indice de

structuration permet d'estimer le taux de migration efficace entre dèmes sous réserve de négliger la mutation)

1). Effet de la propagation asexuée sur la structuration génétique inter-populations

L'un des avantages évolutifs majeurs de la reproduction asexuée résiderait dans sa capacité à conserver les liaisons alléliques inter-loci adaptées aux pressions de sélection locales (Richards 2003). Dans ce cas, on s'attend à ce que chaque dème fixe préférentiellement des combinaisons alléliques spécifiques, soit du fait de la sélection, soit par l'effet de processus stochastique. Par conséquent, intuitivement, on s'attend à ce que les populations utilisant la propagation asexuée affichent une diversité génétique fortement structurée en dème. Cependant, d'après les travaux théoriques de Balloux *et al.* (2003), la reproduction asexuée n'affecterait la structuration génétique inter-populationnelle neutre que lorsque ces populations utiliseraient presque exclusivement la reproduction clonale. Pour des taux de reproduction asexuée supérieurs à 90%, on attend une forte diminution de la différenciation génétique entre populations. En revanche, à partir du moment où ces populations utilisent un taux de reproduction sexuée supérieur à 10%, on attend peu ou pas d'effets de la reproduction asexuée sur les valeurs de F_{ST} . Celles-ci ne devraient alors pas être différenciables de celles attendues lorsque les populations n'utilisent que la voie sexuée pour se reproduire.

Pour ce qui est de l'effet de la propagation asexuée sur la structuration génétique inter-populations, il nous semble donc difficile de faire une prédiction.

2). Impact du GSI sur la structuration génétique inter-populations

Le locus du GSI étant de par son fonctionnement sous sélection fréquence-dépendante négative, toute migration efficace, c'est-à-dire donnant un descendant dans un autre dème soit par migration de pollen soit par migration de graine, qui apporterait dans un autre dème un nouvel allèle S devrait aboutir plus facilement à son établissement dans cette population. En effet, la dérive étant contrée par les pressions de sélection balancées, le nouvel allèle S a sous panmixie une compatibilité de croisements supérieure à celle des autres allèles de la population. Par conséquent, on s'attend à ce que cet allèle S produise un plus grand nombre de croisements viables et que, de fait, sa fréquence allélique augmente à la génération suivante (Wright 1939).

Cependant, l'une des questions consiste à évaluer la capacité d'entraînement du GSI sur la structuration génétique des loci neutres liés et non liés. Si l'on considère les discussions de

Figure 2 : Carte satellitaire de la position des 3 populations d'étude.



Source : Google Earth 2006.

quelques articles (Kercher & Conner 1996 ; Ferrer *et al.* 2004), un système d'auto-incompatibilité serait capable seul de diminuer la structure génétique des loci neutres liés et non liés. A l'inverse, chez une plante à SSI (*Brassica insularis*), les résultats comparés de la structuration inter-populations entre loci microsattellites et locus S montrent que les allèles S chez ce système seraient deux fois plus mobiles que les loci microsattellites (Glémin *et al.* 2005).

Pour ce qui est de l'effet du GSI sur la structuration génétique inter-populations, et en suivant les observations expérimentales de Glémin *et al.* 2005, nous prédisons un niveau de différenciation génétique au locus S plus faible qu'aux autres loci étudiés.

En résumé...

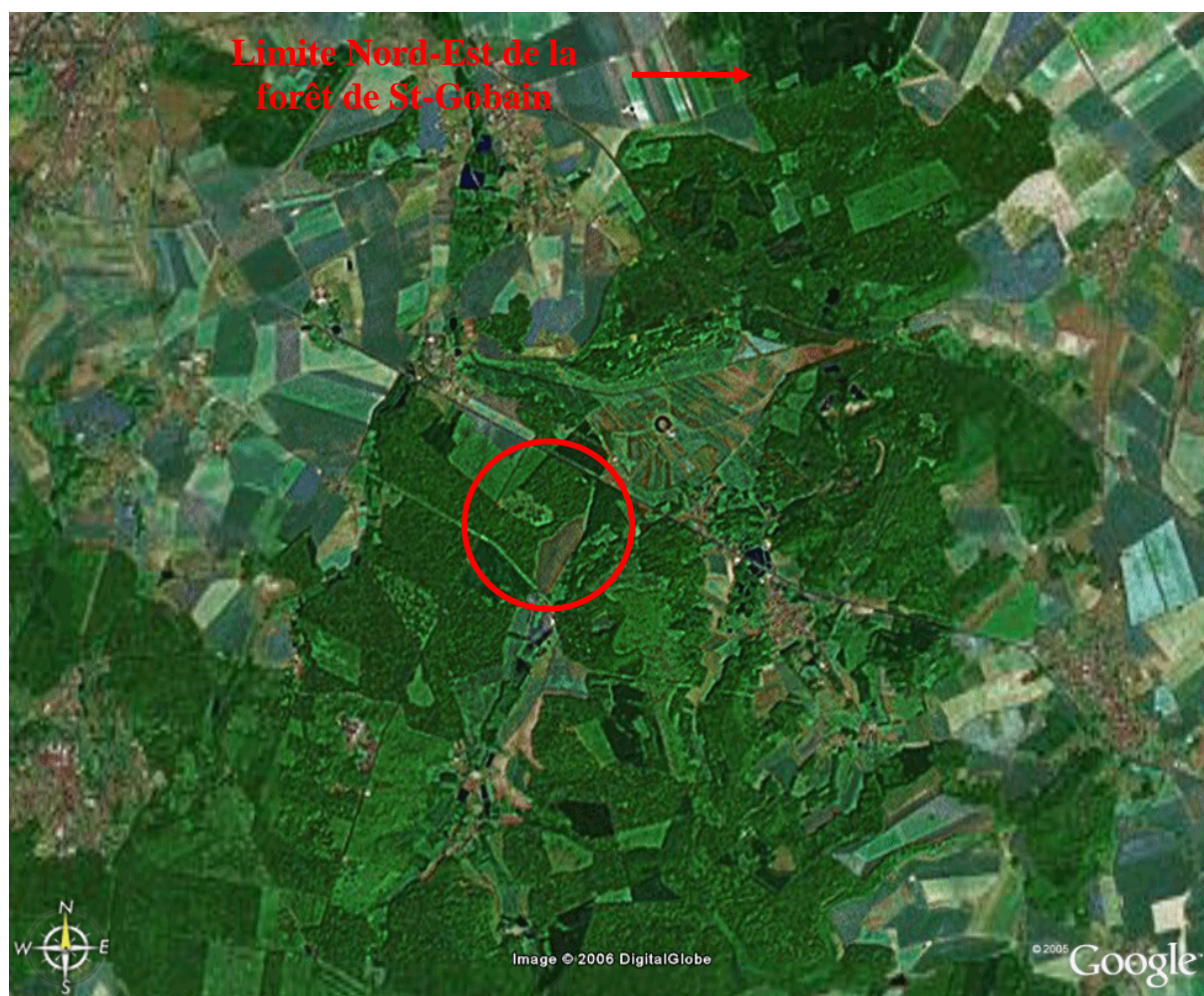
Aucune étude théorique ne permet actuellement de prédire les effets conjoints attendus de l'asexualité et du GSI sur la structuration intra- et inter-populationnelle. Cependant, nous pouvons prédire un excès d'hétérozygotes extrêmement modéré en populations de merisiers se reproduisant partiellement par voie clonale. Nous nous attendons également à observer un excès d'hétérozygotes au locus du système d'auto-incompatibilité gamétophytique et à des loci liés, quelle que soit la taille de la population considérée. Enfin, nous pouvons prédire que la différenciation génétique au locus S devrait être significativement plus faible que la structuration inter-populations aux loci neutres.

II). OBSERVATIONS EXPERIMENTALES DE LA DIVERSITE ET DE SA STRUCTURATION INTRA- ET INTER-POPULATIONNELLE DANS DES POPULATIONS DE MERISIER

A. Populations étudiées

Trois populations ont été choisies parmi les populations identifiées comme candidates au réseau de conservation des ressources génétiques du merisier (Figure 2). Ces populations avaient été retenues soit parce qu'elles présentent des caractères phénotypiques intéressants pour la sylviculture (un ou plusieurs individus de la population d'amélioration viennent d'ailleurs de ces forêts) soit parce qu'elles comportent un grand nombre d'individus âgés et bien portants.

Figures 3 : Vue satellitaire de la population de St-Gobain. Les 3 parcelles formant un μ sont cerclées en rouge (22 ha). Elles se situent dans l'éperon forestier (en vert vif et foncé) Nord-Est de la grande Forêt de St-Gobain.



Les populations de St-Gobain (49°37'N, 3°26'E, Aisne, 02, France) et du Bois de la Comté (45°30'N, 3°20'E, Puy-de-Dôme, 63, France) appartiennent à des massifs forestiers continus implantés sur une large surface (respectivement 6000 et 1500 ha) et principalement composés de feuillus. La population de Pagny-Le-Château (47°01'N, 5°12'E, Côte d'Or, 21, France) fait partie d'un bois isolé s'étendant sur une surface plus faible (110 ha) que les deux massifs forestiers précédents. Ce bois présente la particularité de fournir chaque année une grande partie des graines servant à la régénération des forêts françaises car les arbres qui le composent présentent des phénotypes considérés comme intéressants à la sylviculture (rectitude des troncs, faible nouaison,...). Pour le reste du rapport de thèse, les populations de Bois de la Comté et de Pagny-Le-Château seront respectivement nommées «Comté» et «Pagny».

A St-Gobain, nous avons génotypé de façon exhaustive tous les merisiers adultes trouvés sur trois parcelles (total : 22 ha) situées à l'extrémité au Nord-Est du massif forestier (Figure 3). Nous avons trouvé 261 arbres adultes dont 247 « vivants » c'est-à-dire ayant produit des fleurs ou des feuilles entre Avril et Juin au moins une fois lors des trois années d'études (2002, 2003 et 2004). Par ailleurs, dans les population de Comté et Pagny, 53 et 50 individus « vivants » ont été choisis au hasard mais en évitant de prélever plusieurs individus par isolats (petit groupe ou bouquet local de merisier communément appelé *patch* en anglais). Comme à St-Gobain, les arbres sélectionnés ont été génotypés et cartographiés par GPS.

A St-Gobain, en vue d'analyser l'évolution des valeurs de F_{IS} aux cours du cycle de vie des merisiers, nous avons également considéré deux stages juvéniles. En 2002, 946 graines ont été récoltées sur 24 arbres adultes (Annexe 8). Les embryons ainsi prélevés ont été extraits des merises et débarrassés de leur membrane maternelle. En 2004, les feuilles de 175 juvéniles à l'état de semis ont été récoltées dans la végétation du sous-bois. Leurs racines étaient extraites du sol et vérifiées de façon à éviter de prélever des drageons en formation.

B). Analyse moléculaire des populations

Tous les adultes ont été génotypés avec un set de 8 marqueurs microsatellites couvrant 4 des 8 groupes de liaisons identifiés chez le merisier (voir Annexe 1, Table 1) à partir d'ADN extrait des tissus foliaires. Afin d'étudier l'influence du GSI sur des loci physiquement liés, nous avons choisi d'amplifier deux microsatellites, UDP98-021 et UDP98-412, situés sur le groupe de liaison 6 à proximité (10 cM et 2 cM) du cluster de loci impliqué dans les mécanismes de reconnaissances cellulaires du GSI. Le locus UDP98-412 n'a été amplifié que sur les 3

populations adultes. Les descendants n'ont donc été génotypés qu'avec 7 des 8 marqueurs microsatellites.

Chaque individu, qu'il soit adulte ou descendant, était ensuite typé pour le système d'auto-incompatibilité gamétophytique à partir des conclusions convergentes de trois marqueurs consensus (Sonneveld *et al.* 2003 ; Sonneveld *et al. in press*). Deux de ces marqueurs amplifient le premier intron du locus de la S-RNase (l'une des paires d'amorces permettant le passage sur séquenceur) alors que le troisième amplifie le second intron. Lorsque le typage d'un individu restait incertain, il était alors typé à l'aide d'amorces spécifiques à chaque allèle S connu et déjà décrit chez l'espèce *Prunus avium* (Boskovic et Tobutt 2001 ; Sonneveld *et al.* 2001 ; Sonneveld *et al.* 2003). Par ailleurs, nous avons vérifié que tous les allèles S identifiés à l'aide des amorces consensus correspondaient bien aux allèles déjà décrits dans la littérature. Des échantillons d'individus typés de manière consensuelle pour chaque allèle ont été par la suite génotypés à l'aide de toutes les amorces spécifiques connues. Leurs conclusions étant convergentes, ces manipulations ont permis de valider l'emploi des amorces consensus pour typer les populations forestières de merisier et de vérifier que nos populations ne portaient pas d'allèles S encore inconnus.

C). Méthodes d'analyses

Les paramètres estimant la diversité et la structure génétique des populations, i.e. l'hétérozygotie observée H_O et attendues H_E , la richesse allélique ainsi que les indices de fixation intra-populationnels F_{IS} et inter-populationnels θ (estimateur du F_{ST}), ont été calculés à l'aide du logiciel Fstat v2.9.3.2 (Goudet 1995). Les test de Wilcoxon pour échantillons appariés ont été réalisées à l'aide du logiciel Minitab v14.1 (Minitab Inc.®). Les intervalles de confiances du θ moyen estimés à partir des 7 microsatellites non liés au locus du GSI ont été calculés à l'aide de Genetix v4.05 (Belkhir *et al.* 1996-2004).

Détermination des taches de drageons

Tous les individus portant le même génotype aux 8 loci microsatellites ont été considérés comme appartenant à une même tache de clones. Nous avons estimé la probabilité que deux individus portent le même génotype après un évènement de reproduction sexuée. Cette probabilité d'identité $P_{(ID)}$ est habituellement calculée en considérant que les associations alléliques issues de la reproduction sexuée se font au hasard. Or, chez la plupart des organismes, les croisements se font rarement au hasard que ce soit du fait de la structure génétique, des liens de parenté entre individus ou du fait des systèmes de reproduction qui

Table 1 : Résumé des données moléculaires intra-populationnelles.

| | A | A_E | H_O | H_E | F_{IS} |
|-------------------------------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Comté | | | | | |
| UDP96-005 | 7 | 6,31 | 0,860 | 0,771 | -0,115 |
| BPPCT034 | 8 | 7,48 | 0,780 | 0,711 | -0,097 |
| PCEGA34 | 8 | 7,18 | 1,000 | 0,835 | -0,198 |
| UDP98-411 | 5 | 4,47 | 0,300 | 0,457 | 0,344 |
| BPPCT040 | 8 | 7,38 | 0,857 | 0,748 | -0,146 |
| PS12A02 | 8 | 6,61 | 0,420 | 0,479 | 0,123 |
| UDP98-021 | 4 | 4,00 | 0,480 | 0,651 | 0,262 |
| UDP98-412 | 6 | 5,88 | 0,879 | 0,749 | -0,174 |
| GSI | 13 | 13,00 | 1,000 | 0,907 | -0,103 |
| Pagny | | | | | |
| UDP96-005 | 5 | 4,97 | 0,754 | 0,757 | 0,004 |
| BPPCT034 | 8 | 6,56 | 0,760 | 0,699 | -0,087 |
| PCEGA34 | 11 | 9,21 | 0,959 | 0,846 | -0,133 |
| UDP98-411 | 6 | 5,68 | 0,850 | 0,740 | -0,148 |
| BPPCT040 | 4 | 4,00 | 0,698 | 0,708 | 0,014 |
| PS12A02 | 8 | 7,25 | 0,884 | 0,818 | -0,081 |
| UDP98-021 | 4 | 3,49 | 0,679 | 0,632 | -0,074 |
| UDP98-412 | 6 | 5,83 | 0,793 | 0,750 | -0,057 |
| GSI | 10 | 10,00 | 1,000 | 0,867 | -0,154 |
| St-Gobain adultes | | | | | |
| UDP96-005 | 5 | 4,95 | 0,937 | 0,760 | -0,233 |
| BPPCT034 | 11 | 7,40 | 0,840 | 0,736 | -0,141 |
| PCEGA34 | 15 | 7,99 | 0,855 | 0,757 | -0,130 |
| UDP98-411 | 6 | 5,04 | 0,518 | 0,600 | 0,136 |
| BPPCT040 | 7 | 6,17 | 0,839 | 0,773 | -0,085 |
| PS12A02 | 10 | 7,20 | 0,415 | 0,448 | 0,074 |
| UDP98-021 | 4 | 4,00 | 0,678 | 0,593 | -0,144 |
| UDP98-412 | 7 | 6,31 | 0,843 | 0,761 | -0,108 |
| GSI | 18 | 14,38 | 1,000 | 0,893 | -0,120 |
| St-Gobain juvéniles | | | | | |
| UDP96-005 | 10 | 7,00 | 0,854 | 0,808 | -0,057 |
| BPPCT034 | 10 | 6,86 | 0,682 | 0,720 | 0,053 |
| PCEGA34 | 16 | 9,29 | 0,735 | 0,814 | 0,097 |
| UDP98-411 | 8 | 4,94 | 0,640 | 0,599 | -0,068 |
| BPPCT040 | 8 | 6,34 | 0,716 | 0,751 | 0,046 |
| PS12A02 | 10 | 6,40 | 0,482 | 0,482 | 0,000 |
| UDP98-021 | 5 | 4,11 | 0,437 | 0,457 | 0,044 |
| UDP98-412 | na | na | na | na | na |
| GSI | na | na | na | na | na |
| St-Gobain graines 2002 | | | | | |
| UDP96-005 | 5 | 4,91 | 0,743 | 0,743 | 0,000 |
| BPPCT034 | 12 | 7,66 | 0,750 | 0,755 | 0,006 |
| PCEGA34 | 21 | 8,65 | 0,766 | 0,778 | 0,016 |
| UDP98-411 | 7 | 4,91 | 0,619 | 0,600 | -0,032 |
| BPPCT040 | 7 | 6,23 | 0,741 | 0,769 | 0,036 |
| PS12A02 | 10 | 7,66 | 0,492 | 0,479 | -0,027 |
| UDP98-021 | 4 | 4,00 | 0,569 | 0,578 | 0,015 |
| UDP98-412 | na | na | na | na | na |
| GSI | 19 | 19,00 | 1,000 | 0,904 | -0,104 |

orientent les croisements. Plutôt que d'estimer les probabilités d'identité sous hypothèses de panmixie et d'indépendance des loci, Waits *et al.* (2001) ont proposé de calculer la valeur maximale de la probabilité d'identité, c'est-à-dire la probabilité que deux individus de même génotype soient en fait de pleins frères et soient issus de reproduction sexuée. Cette équation est donnée par Evett & Weir (1998) :

$$P_{(ID)_{sib}} = \prod_k \left[0,25 + (0,25 * \sum p_i^2) + \left[0,5 * (\sum p_i^2)^2 \right] - (0,25 * \sum p_i^4) \right] \text{ où } p_i \text{ est la fréquence allélique du } i^{\text{ème}} \text{ allèle du } k^{\text{ème}} \text{ locus.}$$

D). Résultats

(Des résultats détaillés sont présentés dans l'Annexe 1 concernant l'estimation des valeurs de F_{IS} dans les trois populations considérées)

1). Etat de la diversité génétique neutre intra-populationnelle chez les populations forestières de merisier

Valeurs de richesse allélique, H_E , H_O

Les valeurs de richesse allélique et d'hétérozygotie attendues sont présentées en Table 1.

Déséquilibre de liaison entre loci

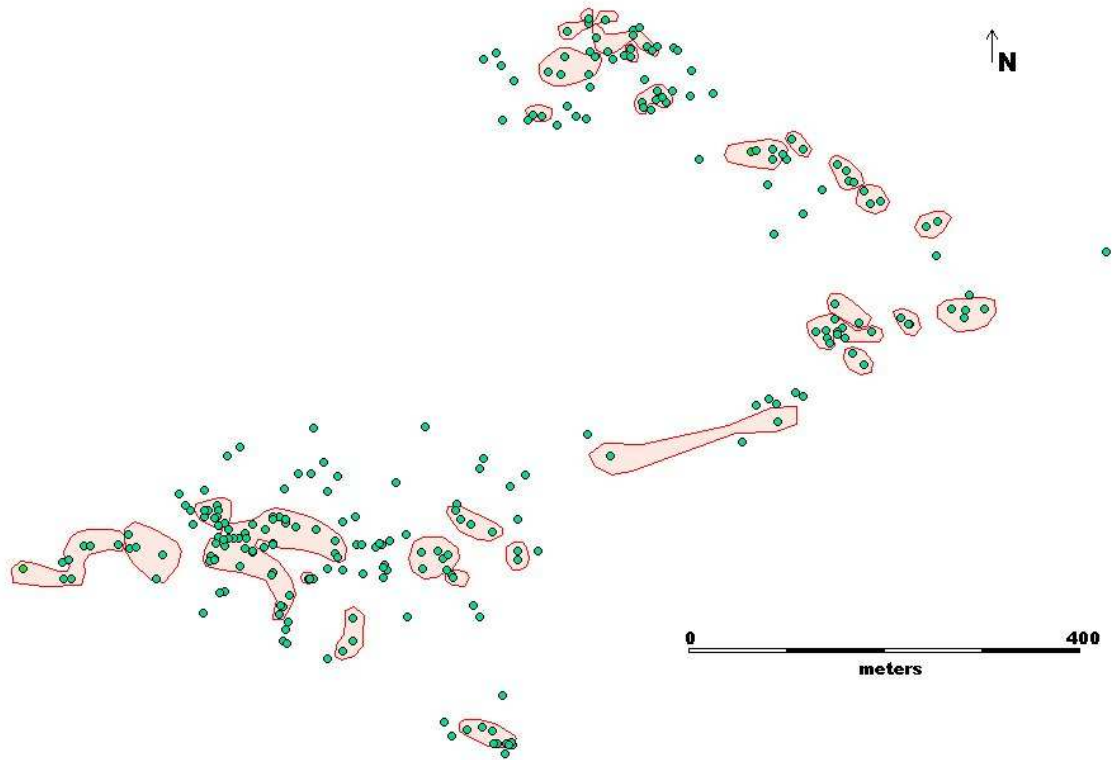
Les déséquilibres de liaison entre loci pour la population de St-Gobain sont donnés en Annexe 1, Table 6. Lorsque tous les individus de la population sont pris en compte, y compris les répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée, tous les loci sont significativement liés les uns aux autres. Lorsqu'on ne tient compte que d'un individu par génotype, on remarque que 13 paires de loci sur 36 présentent un déséquilibre de liaison significatif. Parmi les loci analysés, c'est le locus du GSI qui présente la plus grande proportion de déséquilibres de liaisons significatifs avec les autres loci.

Importance de la propagation asexuée

En considérant que tous les individus porteurs d'un même génotype pour les 8 loci microsatellites sont des clones issus de la propagation asexuée du même génotype, nous prenons un risque inférieur à 2.10^{-3} de nous tromper et de considérer que deux individus frères produits par voie sexuée comme des clones (Evett & Weir 1998). Cette probabilité étant faible, nous considérerons par la suite que les individus ayant des génotypes identiques pour

Figure 4 : Cartographie du positionnement GSP des merisiers (point vert) et des taches des drageonnages (taches rouges) en forêt de St-Gobain.

Carte d'une population de merisiers en forêt de Saint-Gobain (02)



les 8 microsatellites sont des clones d'un même génotype. La Figure 4 présente la répartition spatiale des clones dans la population de St-Gobain.

2). Indices de fixation intra-population

Globalement, dans les 3 populations d'adultes, les valeurs moyennes de F_{IS} des microsatellites sont négatives, de façon significative pour St-Gobain et Pagny, qu'elles prennent ou non en compte les répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée. Cependant, les valeurs de F_{IS} diffèrent selon les loci et les populations considérés. Seuls 3 loci microsatellites présentent des excès d'hétérozygotes et un seul, PCEGA34, de façon significative quelles que soient les populations. Les 5 autres loci ont des valeurs de signe variable selon les populations.

Evolution des valeurs de F_{IS} au cours du cycle de vie des merisiers

Dans la population de St-Gobain, les valeurs de F_{IS} ne changent pas de façon significative entre les 3 classes d'âge analysées (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, $P > 0,447$). Cependant, l'évolution des valeurs de F_{IS} entre les classes d'âge varie selon les loci. A St-Gobain, les valeurs du locus UDP96-005 décroissent au cours du cycle de vie. Les loci PCEGA34, BPPCT040 et UDP98-021 montrent quant à eux une légère diminution de leurs valeurs entre le stade juvénile et le stade adulte. A l'inverse, PS12A02 et UDP98-411 ont des F_{IS} qui augmentent entre le stade juvénile et le stade adulte.

Effet de la reproduction asexuée

Nos résultats montrent que lorsqu'on calcule les valeurs de F_{IS} des populations en prenant en compte les répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée, les valeurs de F_{IS} ont tendance à diminuer mais de façon non significative (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, $P = 0,155$). Cependant, l'hétérozygotie observée ne varie pas lorsqu'on considère d'un côté les génotypes à propagation asexuée ($N = 34$, $H_{O(moyen)} = 0,735 \pm 0,132$) et de l'autre les génotypes non clonaux ($N = 84$, $H_{O(moyen)} = 0,739 \pm 0,149$; $F_{1,114} = 0,02$, $P = 0,901$). De fait, les valeurs de l'hétérozygotie observée ne sont pas significativement modifiées, qu'on tienne compte ou non des répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée lors de leurs calculs (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, $P = 0,722$). Par contre, le fait de tenir compte des répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée diminue significativement les valeurs de l'hétérozygotie attendue (Test de Wilcoxon pour échantillons appariés, $P = 0,033$).

Table 2 : Indice de structuration (θ) entre nos trois populations et estimations du nombre de migrants ($Nm = \frac{1-\theta}{4\theta}$). L'indice θ_{AD} est calculé en tenant compte des répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée, l'indice θ_{SD} en tenant compte d'un seul ramet par genet.

| Marqueur | θ_{AD} | θ_{SD} | Nm_{SD} |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| UDP96-005 | 0,055 | 0,066 | 3,54 |
| BPPCT034 | 0,096 | 0,090 | 2,53 |
| PCEGA34 | 0,072 | 0,057 | 4,14 |
| UDP98-411 | 0,076 | 0,052 | 4,56 |
| BPPCT040 | 0,086 | 0,052 | 4,56 |
| PS12A02 | 0,133 | 0,102 | 2,20 |
| UDP98-021 | 0,083 | 0,110 | 2,02 |
| Tous microsatellites sauf UDP98-412 | 0,084 | 0,074 | 3,12 |
| (\pm écart-type) | ($\pm 0,008$) | ($\pm 0,009$) | |
| UDP98-412 | 0,029 | 0,016 | 15,38 |
| Locus du GSI | 0,042 | 0,023 | 10,62 |

Effet du GSI sur les valeurs de F_{IS}

Comme attendu, le locus du GSI présente des valeurs de F_{IS} significativement négatives dans les 3 populations adultes. UDP98-412 situé à 2cM de ce locus présente des valeurs de F_{IS} négatives proches de celles de GSI dans les 3 populations. A l'inverse, le locus UDP98-021 situé à 10 cM du locus du GSI présente parfois des valeurs de F_{IS} positives et souvent éloignées de celles du GSI.

3). Indice de fixation inter-populations

Les résultats obtenus sont présentés Table 2.

F_{ST} des microsatellites

Que l'on fasse le calcul avec ou sans répétitions de génotypes, tous les microsatellites ont des valeurs de différenciation supérieure à 0,05 ($\theta_{\text{moyen}}=0,074$ sans répétitions de génotypes). Le taux de migration estimé à partir des valeurs de différenciation ($Nm=\frac{1-\theta}{4\theta}$) représente entre 2,2 à 4,6 individus par génération ($Nm_{\text{moyen}}=3,4$ sans répétitions de génotypes).

F_{ST} au locus S

Le locus du GSI présente une différenciation de 0,023. Elle est aussi significativement plus faible que tous les autres marqueurs microsatellites lorsque UDP98-412 n'est pas pris en compte (intervalle de confiance des valeurs de F_{ST} microsatellite à 95%: [0,060 ; 0,092]). Situé à 2 cM du locus du GSI, la différenciation du locus UDP98-412 ($\theta=0,016$) est aussi significativement plus faible que celle des autres marqueurs microsatellites et plus proche de celle observée chez le locus du GSI.

Impact de la propagation asexuée sur le F_{ST}

Globalement, la différenciation prenant en compte les répétitions de génotypes dues à la reproduction asexuée ne sont pas différents de ceux calculés avec un individu par génotype, qu'on tienne compte d'UDP98-412 (N=8) et du locus du GSI (N=9), ou non (N=7) ($P>0,124$, test de Wilcoxon pour échantillons appariés). Cependant, la différenciation tend à être globalement moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes sauf pour les locus UDP96005 et UDP98-021. Sur les 8 loci microsatellites, 48 allèles (61,5%) ont montré une valeur de différenciation plus élevée lorsqu'elle était calculée en tenant compte des répétitions des génotypes drageonnant, 23 (29,5%) ne voient pas leur différenciation

affectée par la prise en compte des répétitions des génotypes drageonnant (Annexe 7). Le locus du GSI montre les mêmes tendances : 14 allèles (77,8%) montrent des valeurs de différenciation moindres lorsqu'on ne tient compte que d'un individu par génotype.

III). INTERPRETATION ET DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS PAR VOIE EXPERIMENTALE

A). Comment expliquer les F_{IS} négatifs rencontrés dans les populations forestières de merisier ?

Nos résultats montrent que dans nos populations de merisiers adultes, près d'un arbre sur deux est un ramet d'un genet se propageant par voie asexuée. Les valeurs négatives des F_{IS} obtenues sur microsatellites confirment la tendance de cette espèce à présenter des excès d'hétérozygotes à des loci supposés neutres (Frascaria *et al.* 1993 ; Ducci & Santi 1997 ; Annexe 5). Nous avons identifié quatre causes possibles aux excès d'hétérozygotes observés dans les populations adultes (voir Annexe 1). Nous ne discuterons ici que des effets potentiels du système de reproduction du merisier sur les excès d'hétérozygotes.

Effet de la propagation asexuée sur les valeurs de F_{IS}

Les génotypes montrant une capacité à se reproduire partiellement par voie asexuée ne sont pas plus hétérozygotes que les individus qui ne présentent pas de preuve de leur capacité à la propagation asexuée. Chez les merisiers, et contrairement à ce qui a été observé chez d'autres espèces (Judson & Normark, 1996; Delmotte *et al.* 2002 ; Lamont & Wiens 2003), la reproduction asexuée ne semble donc pas favoriser l'accumulation indépendante de mutations sur les allèles d'un même locus. Cependant, nous ne disposons pas d'informations sur l'histoire des génotypes de nos populations. Nous n'excluons donc pas la possibilité que certains individus, uniques représentants d'un génotype, ne proviennent pas de lignées clonales par mutation ou bien ne soient pas les derniers descendants d'une lignée clonale. Ainsi nous avons identifié deux taches de drageons proches spatialement et dont le génotype ne diffère que par un allèle à un locus microsatellite. Cependant, la probabilité d'observer un grand nombre de ces phénomènes parmi nos 117 génotypes est faible. Par ailleurs, tous les génotypes de merisiers pourraient être aptes dans certaines conditions environnementales à développer des drageons. Dans ce cas, les populations de merisier n'hébergeraient pas de « lignées clonales » dont les génotypes seraient maintenus sur des plages temporelles

suffisantes pour observer l'apparition de mutations indépendantes sur les allèles des loci microsatellites, mais des génotypes ayant développé des drageons du fait d'aléas environnementaux.

Les valeurs de l'hétérozygotie espérée sont significativement plus faibles lorsque les valeurs des fréquences alléliques tiennent compte des répétitions de génotypes dues au drageonnage. La prise en compte des répétitions de génotypes dues au drageonnage aurait donc pour effet d'augmenter les fréquences alléliques de certains allèles et de diminuer celles des allèles les moins portés par les génotypes drageonnant. Cette différence serait responsable du fait qu'on observe un excès d'hétérozygotes plus fort lorsque les F_{IS} sont calculés en prenant compte des répétitions de génotypes liés à la propagation asexuée. En conclusion, l'excès d'hétérozygotes observé en tenant en compte tous les individus proviendrait dans notre cas non pas d'une hétérozygotie observée plus grande des individus drageonnant mais de l'hétérozygotie espérée plus faible quand nous prenons en compte tous les individus dans la population.

Enfin, tous les loci sont significativement liés les uns aux autres lorsqu'on calcule les déséquilibres de liaison en tenant compte de tous les ramets des genets clonaux. Si on ne considère qu'un ramet par genet, 13 paires de loci sur 36 apparaissent significativement liés.

Effet du GSI sur les valeurs de F_{IS}

Nos données constituent un premier élément de confirmation de l'effet d'un locus du GSI sur des loci neutres liés et non liés prédit par le modèle théorique de Glémin *et al.* (2001). Le locus UDP98-412 à 1cM du locus du GSI présente des excès d'hétérozygotes proches de ceux présentés par le locus du GSI. A l'inverse, l'hétérozygotie de loci microsatellites non liés physiquement ou physiquement liés mais plus éloignés (10 cM) ne semble pas être affectée par les effets de la sélection balancée au locus du GSI. Ce résultat rejette l'idée d'un effet global d'entraînement des loci neutres ou des génomes vers des excès d'hétérozygotes chez les espèces dont la reproduction est contrôlée par un locus sous sélection balancée (Kercher & Conner 1996 ; Ferrer *et al.* 2004 ; Lukas *et al.* 2004).

Cependant, même en ne prenant en compte qu'un génotype par genet, les F_{IS} calculés montrent que les populations étudiées ont une légère tendance à présenter des excès d'hétérozygotes dont l'origine reste inexplicée.

Possibilité d'un effet conjoint de l'asexualité et du GSI sur la diversité intrapopulationnelle ?

Pour expliquer l'origine du nombre élevé de déséquilibres de liaison entre loci et la tendance à observer des excès d'hétérozygotes aux loci neutres, nous pourrions faire l'hypothèse d'un effet conjoint de la propagation asexuée et du GSI sur la structuration génétique des loci neutres dans les populations de merisier.

Une première hypothèse consisterait à supposer que les populations de merisier comporteraient des lignées constituées de clones et de fratries plus souvent porteurs des mêmes allèles du GSI que le reste de la population. L'intégrité génétique de ces lignées serait maintenue dans le temps par la reproduction asexuée, les générations chevauchantes et une forte structuration spatiale de la diversité aboutissant à l'observation des croisements préférentiels et à un faible taux de polyandrie. Du fait de la restriction du nombre de croisements possibles par le GSI en population finie (Vekemans *et al.* 1998), la plus grande partie des croisements aurait lieu entre individus de lignées différentes. Chez les chauve-souris *Cynopterus sphinx*, Storz *et al.* (2001) ont montré que les F_{IS} négatifs observés sur des marqueurs microsatellites pouvaient s'expliquer par un système de reproduction particulier. Chez cette espèce, les comportements sociaux induisent que tous les croisements se font entre des femelles vivant sédentairement dans la grotte occupée par la colonie de ses parents et quelques mâles immigrant d'autres colonies. Les grottes abritent donc des lignées matrimoniales dont la composition allélique évolue au fil des générations mais dont les fréquences alléliques en moyenne continuent de différer de celles des autres colonies. Les descendants ainsi générés sont donc issus de la rencontre de pools génétiques dont les fréquences alléliques diffèrent en moyenne. Ce système de reproduction suffirait à créer un léger excès d'hétérozygote aux loci microsatellites de cette espèce. Dans ce cas, la déviation des attendus sous les hypothèses d'Hardy-Weinberg serait directement proportionnelle à la variance génétique interlignée (Chesser 1991).

Une autre hypothèse consisterait à considérer les déséquilibres de liaisons entre loci neutres non physiquement liés au GSI et le locus du GSI même, comme origine potentielle des légers excès d'hétérozygotes observés chez les merisiers. D'après la revue d'Halkett *et al.* (2005), les individus se reproduisant par voie asexuée peuvent créer ces déséquilibres de liaison. Chez les merisiers, ces déséquilibres de liaison pourraient être amplifiés du fait de la sélection au locus du GSI, contraignant les loci neutres à se comporter comme s'ils étaient liés au locus du GSI. Ainsi, des excès d'hétérozygotes plus forts pourraient être créés par les effets conjoints de la propagation partiellement asexuée et du GSI.

Cependant, nous n'observons pas de tendance à un excès d'hétérozygotes chez les descendants. Ces hypothèses ne sont donc pas soutenues par le mode de fonctionnement

actuel de la reproduction sexuée de merisiers à St-Gobain. Nous avons donc commencé à modéliser quels pourrait être les effets combinés de la propagation partiellement asexuée et du GSI sur les valeurs de F_{IS} au sein de population finie et à regarder si ces interactions peuvent être à l'origine des faibles excès d'hétérozygotes observés dans les populations de merisiers.

B). Une structuration inter-populations moyenne entre populations de merisier

La structuration génétique inter-populations estimée à partir des microsatellites est supérieure à 0,05, une valeur intermédiaire entre une diversité génétique faiblement structurée ($F_{ST} < 0,05$) et une forte différenciation génétique des dèmes ($F_{ST} > 0,2$). Le taux de migration entre les trois populations est estimé à $Nm \approx 3$.

Ces valeurs de F_{ST} calculées à partir de microsatellites sur nos 3 populations sont comparables aux valeurs précédemment calculées sur respectivement 4 et 5 autres populations à l'aide d'isozymes ($F_{ST} = 0,049$, Frascaria *et al.* 1993 ; $F_{ST} = 0,052$, Mariette *et al.* 1997). Par ailleurs, à l'aide de microsatellites, Tavaud (2002) a estimé la structuration génétique au niveau européen entre populations d'Europe de l'Ouest et Roumanie à $F_{ST} = 0,072$ et populations d'Europe de l'Ouest et Géorgie à $F_{ST} = 0,071$. Ces résultats montrent que la valeur de la structuration génétique neutre inter-populations chez les merisiers européens est globalement comprise entre 0,05 et 0,1. La diversité génétique de l'espèce semble donc structurée en dèmes moyennement différenciés.

C). Impact de la reproduction partiellement asexuée sur la structuration génétique inter-populations

Tout d'abord il semblerait que la prise en compte des répétitions des génotypes se reproduisant partiellement par voie asexuée influence légèrement les valeurs de différenciation génétique inter-populations. Nous avons observé une structuration génétique légèrement plus forte lorsque nous tenons compte des répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée. Ces résultats vont à l'encontre des prédictions du modèle théorique de Balloux *et al.* (2003) qui prévoit que la différenciation génétique inter-populations devrait décroître lorsque le taux de reproduction asexuée augmente et dépasse des valeurs de 0,9. Cependant, le modèle de Balloux *et al.* (2003) inclut que les clones puissent migrer entre populations, comme c'est le cas chez beaucoup d'animaux (cas par exemple des Annélides : Nilsson *et al.* 2000 ; Crustacées : Haag *et al.* 2002 ; Aphides : Guillemaud 2003 ; Plathelminthes : Prugnolle *et al.* 2005). Les prédictions du modèle de Balloux *et al.* (2003) ne

peuvent donc s'appliquer aux plantes que dans le cas d'espèces qui n'utilisent que l'agamospermie comme seul mode d'apomixie. A notre connaissance, le merisier n'est pas capable de se reproduire par agamospermie. L'apomixie chez cette espèce n'étant représentée que par le drageonnage, sa dispersion clonale est limitée à quelques dizaines ou centaines de mètres. La migration inter-populations implique donc forcément des événements de reproduction sexuée (dispersion du pollen ou des graines), et non pas asexuée. Cette différence constitue une explication plausible aux faits que les résultats observés chez le merisier divergent des prédictions que nous avons faites à partir du modèle théorique proposé par Balloux *et al.* (2003). Comme précédemment exposé, nous avons commencé à développer un modèle simulant le cycle de vie du merisier en populations structurées. A partir de ces simulations, nous avons la perspective de formuler des valeurs de structurations génétiques inter-populations attendues dans le cas de populations se reproduisant partiellement par voie asexuée et dont les clones seraient incapables de se disperser.

Pour nous, l'augmentation de la différenciation inter-populations liée à la prise en compte des répétitions des génotypes clonaux traduit le fait que les génotypes qui se reproduisent partiellement par voie asexuée ne portent pas les mêmes allèles microsatellites suivant les populations.

D). Structuration génétique d'un locus sous sélection fréquence-dépendante négative

Le locus du GSI présente une valeur faible de différenciation, inférieure à la limite de 0,05. Les estimations de la mobilité des allèles montrent que celle-ci est 2 à 3 fois plus grande que celles estimées pour les microsatellites. Nos résultats empiriques confirment les attendus théoriques énoncés par Wright (1939). Par ailleurs, UDP98-412 à 1cM du locus du GSI présente une structuration génétique plus proche de celle du GSI que celles observées chez les autres loci neutres du génome. Cette valeur argumente en faveur d'un entraînement de ce locus par les pressions de sélection fréquence-dépendante négative inhérente au GSI. A l'inverse, UDP98-021 présente une structuration génétique trois fois plus élevée que celles d'UDP98-412 et du locus de GSI. Cependant, l'observation du comportement de ces 2 loci n'est pas suffisante pour pouvoir conclure sur la capacité du GSI à influencer la structure génétique des loci neutres qui lui sont liés. Un plus grand nombre de loci et de populations seraient nécessaires pour pouvoir statistiquement estimer l'influence du GSI sur les loci neutres qui lui sont liés.

Le GSI, un cluster de loci sous sélection fréquence-dépendante négative, présente donc une structuration génétique significativement plus faible que celle de loci neutres non liés. Par ailleurs, ce locus pourrait affecter par entraînement la structuration génétique d'un locus neutre lié pourtant distant d' 1cM. Nos observations n'argumentent pas en la faveur d'un possible effet d'entraînement du locus du GSI sur la structuration de l'ensemble de la diversité génétique neutre du merisier.

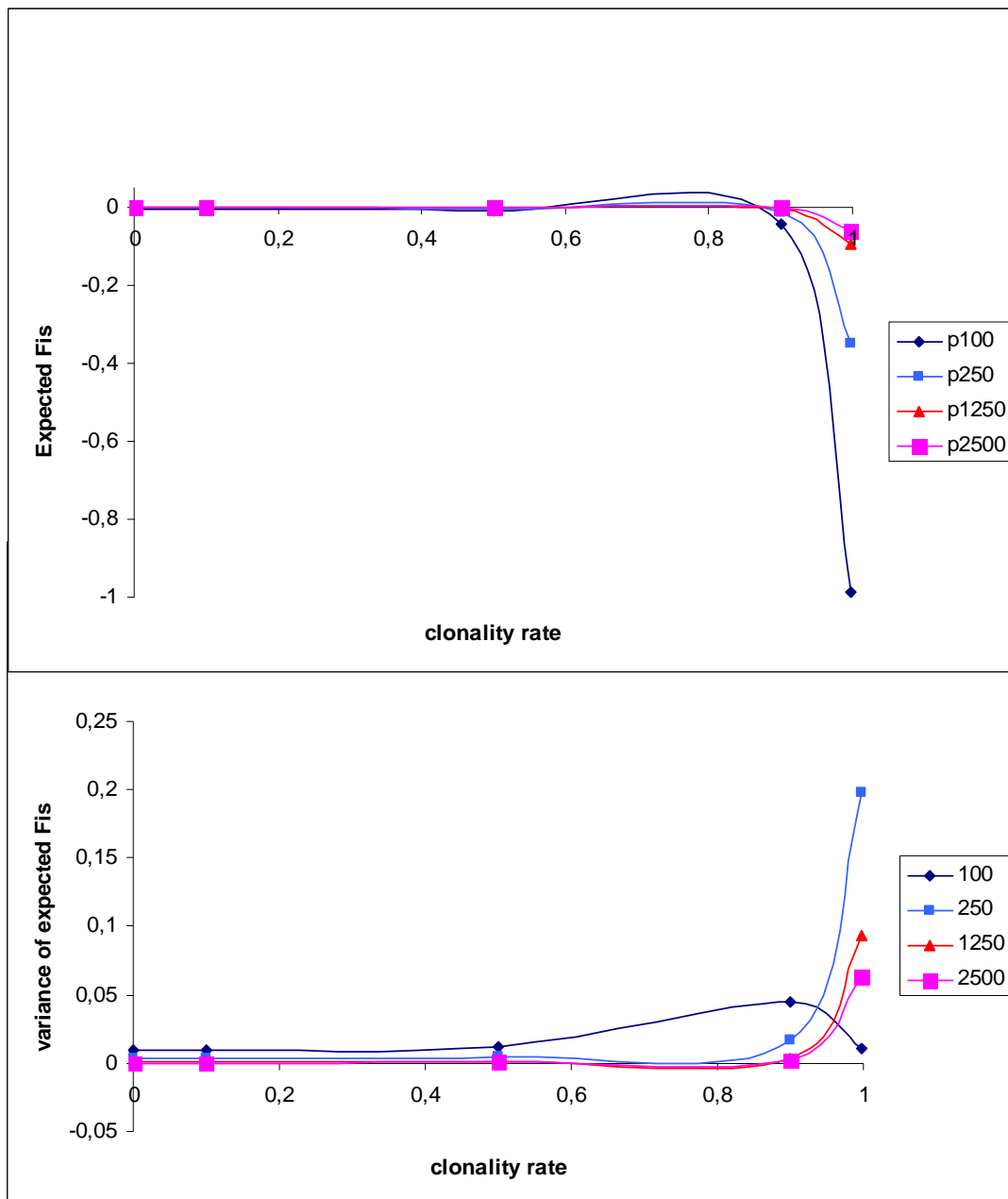
E). Perspectives

Nos résultats montrent que nous connaissons actuellement peu de choses concernant l'effet potentiel des systèmes mixtes de reproduction sur la diversité génétique et sa structuration. Or ces systèmes jouent un grand rôle sur la diversité, la structuration et la dynamique de la variabilité génétique. Chez les plantes, l'effet seul de la propagation partiellement asexuée nécessite la formulation de prédictions adaptées via des modèles théoriques prenant en compte leurs spécificités biologiques. Nous avons donc créé un modèle reproduisant le cycle de vie des merisiers et simulant le fonctionnement de populations finies et structurées. Pour l'instant, ce modèle permet de suivre l'évolution de marqueurs type microsatellites dans des populations finies de merisiers structurées en classes d'âges, se propageant partiellement par drageonnage et se reproduisant en partie par voie sexuée sous contrôle d'un GSI. Il permet de faire varier le caractère héréditaire ou non de la propagation asexuée, la proportion reproduction asexuée/reproduction sexuée et la vigueur respective des clones par rapport aux descendants issus de la reproduction sexuée, de tenir compte de la liaison ou non des microsatellites au locus du GSI, du nombre d'allèles S du GSI et de la taille des populations. L'objectif de ce modèle est de répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les F_{IS} attendus chez les plantes se propageant partiellement par apomixie non agamospermique ?
- Quels sont les effets conjoints de la reproduction asexuée et du GSI chez une espèce en générations chevauchantes sur sa diversité génétique intra et inter populationnelle ?
- Le GSI peut-il entraîner la structuration et la diversité génétique de loci type microsatellites liés et non liés ?

Le modèle est développé de façon à prendre en compte les caractéristiques biologiques du merisier, à pouvoir activer ou non une caractéristique et à en faire varier l'intensité. A terme, nous aimerions pouvoir tester toutes les hypothèses soulevées par nos résultats empiriques. Il prendra bientôt en compte des événements de migration entre ces populations, une

Figure 5 : a) Fis moyen attendus dans une population de taille (p) finie en fonction du taux de reproduction asexuée (clonality rate). Chaque courbe estimée correspond à une taille fixe de population (exemple : $p100$, pour une population de 100 individus). Les Fis moyens sont calculés comme la moyenne des Fis obtenus sur 10 000 évènements de reproduction sexuée successifs à 30 loci « neutres » indépendants.
 b) variance sur 30 loci des mêmes Fis.



structuration spatiale des individus au sein des populations complétée par une reproduction sexuée soumise à une dispersion pollinique distance-dépendante et l'existence d'un locus soumis à sélection.

La partie qui suit présente les premiers résultats obtenus par le modèle et discute les premiers éléments de réponse qu'on peut en tirer pour répondre aux questions soulevées.

1). Quels sont les F_{IS} attendus chez les plantes se propageant partiellement par apomixie non agamospermiq

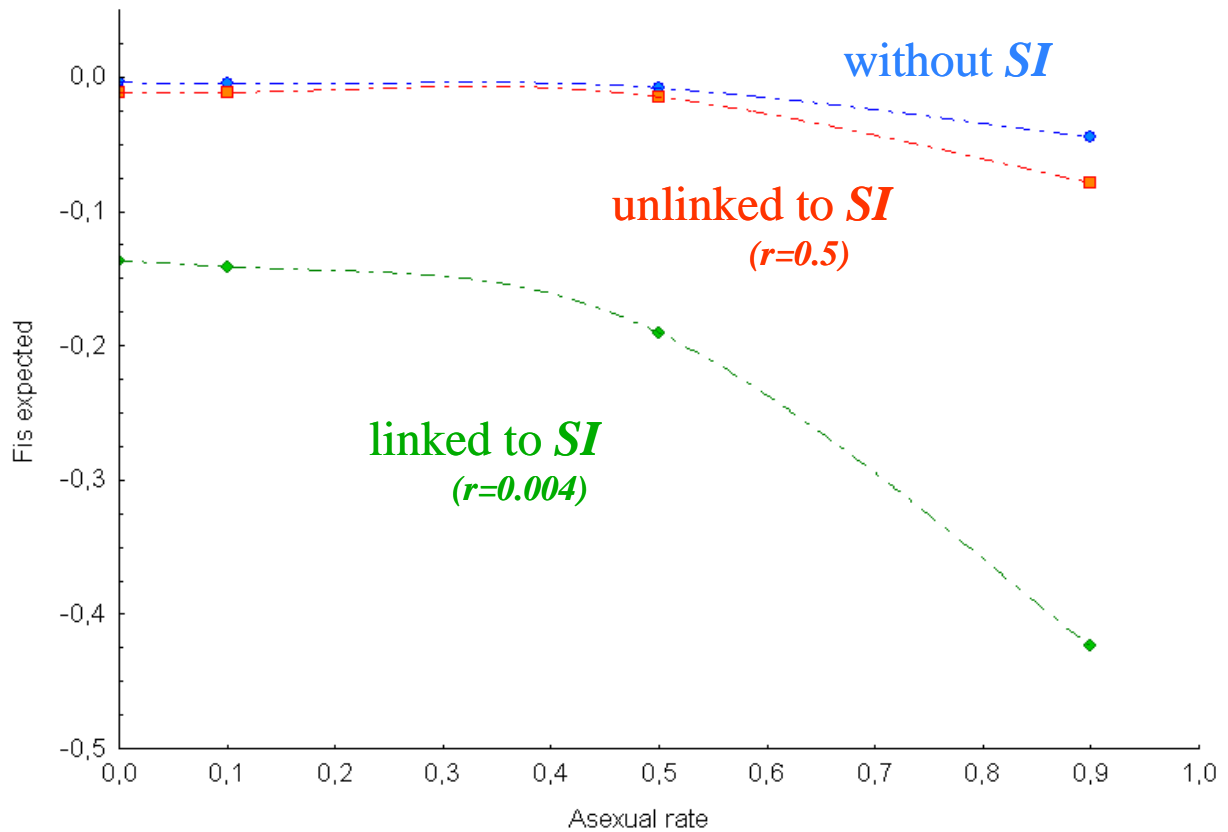
Pour répondre à cette question, nous avons simulé 10000 cycles de reproduction sexuée consécutifs d'une population de taille finie se propageant partiellement par voie asexuée et utilisant une reproduction sexuée de type panmictique. Les F_{IS} ont été synthétisés en une moyenne et variance des valeurs obtenues sur les 10000 générations à 30 loci. Nous avons relevé le nombre moyen de générations nécessaires pour que tous les loci fixent un de leurs deux allèles.

Les premiers résultats sont représentés Figure 5.

Concernant les valeurs de F_{IS} espérées, on remarque que pour des taux de clonalité inférieurs à 0,9, les F_{IS} attendus sont très légèrement négatifs mais très proches de zéro. Pour des taux de clonalité supérieurs à 0,9, les F_{IS} espérés deviennent très négatifs. La variance des F_{IS} espérés augmente lorsque le taux de clonalité augmente et ce, plus particulièrement lorsque les taux de clonalité dépassent 0,9. Par ailleurs, plus la taille de la population est petite, plus faibles sont les valeurs espérées de F_{IS} . A l'inverse la variance augmente lorsque la taille des populations diminue sauf pour un taux de clonalité de 0,9999 : la variance des F_{IS} espérés est plus petite que celle espérée pour des tailles de populations supérieures. Nous obtenons donc des résultats similaires à ceux présentés par Balloux *et al.* (2003) et Bengtsson (2003).

Le suivi de l'évolution des F_{IS} au cours des générations nous a permis de comprendre le mécanisme sous-jacent créateur de F_{IS} négatifs pour des taux de clonalité supérieur à 0,9 : parmi les 30 loci, beaucoup fixent au cours des générations un des deux allèles disponibles à équifréquence lors de l'initialisation de la population. La population finit au bout de quelques générations par n'être plus composée que de quelques, voire un seul clone. Un effet de dérive (effet stochastique aboutissant à la perte démographique de génotypes clonaux et à la conservation d'un seul genet dans la population) a conduit à la conservation soit d'un seul allèle à l'état homozygote soit de deux allèles à l'état hétérozygote. Lorsque cette dérive conserve un génotype hétérozygote, l'hétérozygotie à ce locus est de fait supérieure à l'hétérozygotie attendue dans les conditions de l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Comme le F_{IS}

Figure 6: F_{IS} moyen sur 30 loci « neutres » attendus sur 10 000 générations dans une population finie ($N=100$) d'arbres structurés en classes d'âge se propageant partiellement par voie asexuée. En bleu, cette population n'a pas de GSI. En rouge, cette population combine propagation partiellement asexuée et sexuée sous contrôle d'un GSI disposant initialement de 8 allèles S, les valeurs de F_{IS} sont données pour des loci « neutres » indépendants du locus du GSI ($r=0,5$). En vert, les loci « neutres » considérés ont un taux de recombinaison avec les allèles S du GSI de $r=0,004$.



ne peut être calculé à un locus que si celui-ci présente au moins un individu hétérozygote, l'hétérozygotie observé de la population ne tient donc compte que des loci ayant fixé un génotype hétérozygote ce qui explique les valeurs extrêmement fortes d'excès d'hétérozygotes. Quelques événements de reproduction sexuée suffisent alors à modifier l'hétérozygotie figée par la reproduction asexuée et à réintroduire la possibilité que le locus fixe un des deux allèles par effet de dérive. En suivant ce fonctionnement, peut-on dire que l'asexualité conserve la diversité allèlique ? Nous avons pour objectif d'utiliser des loci comportant plus de 2 allèles et d'introduire des contraintes spatiales limitant la taille de clones pour que les populations simulées soient plus réalistes avec la réalité biologique.

2). Quels sont les effets conjoints de la reproduction asexuée et du GSI chez une espèce en générations chevauchantes sur sa diversité génétique intra et inter populationnelle ?

Nous avons simulé dans les mêmes conditions l'évolution d'une population de taille finie au sein de laquelle le locus du GSI a été activé. Nous avons fait varier le taux de recombinaison entre locus « neutres » et locus du GSI ainsi que le nombre d'allèles S disponibles dans la population.

Seuls les résultats obtenus sur une population de 100 individus sont présentés Figure 6. Les premiers résultats montrent que les F_{IS} varient toujours en fonction du taux de reproduction asexuée et suivent une courbe similaire de celle obtenue dans des populations se reproduisant sans GSI. Par ailleurs, nous obtenons des résultats similaires à Glémin *et al.* (2001) : lorsque le taux de recombinaison entre le locus du GSI et un locus « neutre » diminue, l'excès d'hétérozygotes attendu au locus neutre augmente. Enfin, le résultat majeur de ces simulations montre que, lorsqu'une population combine à la fois une propagation partiellement sexuée (taux de propagation asexuée supérieur à 0,5) et une reproduction sexuée sous GSI, les F_{IS} espérés sont légèrement « plus négatifs » que ceux attendus sous le seul effet de la propagation partiellement asexuée (courbe rouge et courbe violette). Nous avons pour objectif de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ce potentiel effet conjoint d'une reproduction mixte sur les valeurs de F_{IS} espérés notamment en analysant les variances respectives. Par ailleurs, nous regarderons ce potentiel effet dans le cadre d'une population structurée en dème.

Le travail de simulation se poursuivra après la soutenance de thèse afin d'énoncer des prédictions des effets attendus du système de reproduction du merisier sur les valeurs de F_{IS} espérés aux loci neutres liés et non liés au GSI.

VI). DISTRIBUTION DES FREQUENCES ALLELIQUES POUR UN LOCUS SOUS FREQUENCE-DEPENDANCE DANS UNE POPULATION STRUCTUREE

En 1939, Wright propose que la principale force influençant les fréquences des allèles des loci d'auto-incompatibilité soit une sélection de type fréquence-dépendante négative. Les allèles du GSI les plus rares participent plus à la production de la génération suivante puisqu'ils sont plus souvent compatibles lors des croisements que les allèles les plus communs. Cette force de sélection fréquence-dépendante négative permettrait aux allèles des loci sous son influence d'échapper à la dérive. Malgré un modèle simple, cette idée que les allèles sous forte sélection fréquence-dépendante négative devraient être présents au sein des populations à des fréquences alléliques identiques ou très proches de la valeur d'équilibre telle que définie par Wright (1939) reste fortement ancrée dans les esprits des biologistes. Dans cette partie, nous nous intéresserons à l'effet de la structuration génétique sur la diversité génétique d'un locus sous forte sélection fréquence-dépendante négative et plus particulièrement à la distribution des fréquences alléliques attendues et observées au locus du GSI chez le merisier.

A). Hypothèses

Wright (1939) a montré que dans le cas d'une population panmictique infinie, on s'attend à ce que tous les allèles du locus du GSI présentent une même et unique fréquence allélique (isoplèthie des fréquences alléliques) égale à $1/n$ où n correspond au nombre d'allèles dans la population. Dans le même papier, Wright améliore son modèle de façon à prendre en compte les effets stochastiques de la dérive sur les fréquences alléliques dans le cas d'une population finie. D'après ce nouveau modèle, la distribution des fréquences alléliques d'un locus du GSI à l'équilibre sélection, dérive et migration (ou mutation) dans une population panmictique de taille finie devrait se présenter sous la forme d'une « courbe en cloche » (*bell shape*) centrée sur la valeur de l'équilibre isoplèthe (la valeur des fréquences alléliques obtenue si la population avait été infinie).

Deux récentes revues sur la génétique des populations de l'auto-incompatibilité homomorphe (SSI et GSI) recensent 19 espèces (16 genres) dont le nombre et la fréquence des types sexuels sont connus (Lawrence 2000 ; Castric & Vekemans 2004). Dix des treize espèces se reproduisant sous contrôle d'un GSI présentent des distributions alléliques intra-populationnelles qui ne peuvent être différenciées de l'isoplèthie des fréquences. Cependant, deux espèces, *Prunus lamnesiana* (Kato & Mukai 2004) et *Papaver rhoeas* (Campbell & Lawrence 1981), présentent des distributions de fréquences alléliques différentes des attendus

du modèle de Wright en population finie. La plupart des plantes présentent une diversité génétique structurée spatialement (Rousset & Ronce 2004). En 1998, Schierup propose un modèle estimant le nombre d'allèles du GSI et leurs fréquences attendues en population finie mais spatialement structurée en dèmes. Concernant les fréquences alléliques, trois situations se dégagent du modèle :

(1) lorsque la structuration spatiale inter-dèmes est faible ($Nm \approx 50$), on attend une distribution des fréquences alléliques de type « courbe en cloche » au niveau d'un dème et au niveau de l'espèce complète (de tous les dèmes). Du fait d'échanges fréquents d'allèles entre dèmes, chaque population devrait alors échantillonner la plupart des allèles disponibles au niveau de la population globale. L'espèce fonctionnerait alors globalement comme un super dème, assimilable à une grande population de taille finie.

(2) lorsque la différenciation inter-dèmes est forte ($Nm < 0,05$), on s'attend à ce que la distribution des fréquences alléliques à l'intérieur d'un dème reflète l'isopléthie (« courbe en cloche »). Cependant, chaque dème comporte alors des allèles plus ou moins « endémiques » mais à une fréquence proche voire identique à la valeur d'équilibre prédite par Wright ($=1/n$, 1939). Au niveau de la population globale, la distribution des fréquences alléliques dévie d'une courbe en cloche et ce, d'autant plus que la différenciation inter-dèmes est forte. Du fait de l'isolement de chaque dème, ceux-ci subissent des effets de dérive indépendants modelant les fréquences alléliques à l'échelle de l'espèce. La forte structuration ne favorisant pas la propagation des allèles émergents aux autres dèmes, un grand nombre d'allèles restent endémiques à un dème et présentent donc des fréquences alléliques faibles à l'échelle de l'espèce. Seuls peu d'allèles apparaissent donc, par chance, plus souvent représentés dans l'ensemble des dèmes de l'espèce et présentent par conséquent des fréquences alléliques plus élevées.

(3) et une situation intermédiaire, identifiée par Schierup (1998) comme un $Nm \approx 2,5$, où les distributions des fréquences alléliques inter-populations dévient des attendus de Wright, c'est-à-dire d'une distribution de type isoplèthe/courbe en cloche. Dans ces dèmes, l'état d'équilibre des distributions des fréquences alléliques ne peut y être atteint du fait d'un apport constant de nouveaux allèles par migration. Cependant, la migration n'est pas suffisante pour limiter les effets locaux de la dérive et le maintien d'allèles endémiques. Mais elle est aussi suffisante pour apporter à chaque génération une faible quantité d'allèles nouveaux aux dèmes.

D'après les valeurs de F_{st} trouvé chez nos populations de merisiers, nous nous trouvons dans une situation où $Nm \approx 3$, par conséquent dans cette situation intermédiaire identifiée par Schierup (1998). Nous avons donc examiné la répartition des fréquences alléliques au locus S dans nos populations et testé son isoplèthie afin de savoir si la répartition observée correspond aux prédictions faites par Schierup (1998) dans le cadre d'une structuration inter-dèmes intermédiaire. Ce travail s'effectue en collaboration avec Vincent Castric et Xavier Vekemans et fait l'objet de la rédaction d'un manuscrit, cependant pas assez avancé pour être intégré dans ce manuscrit. Nous donnons les méthodes ainsi que les premiers résultats de cette étude dans ce qui suit.

B). Methodes

Distributions attendues des fréquences des allèles S en population structurée

Nous avons utilisé une version améliorée du programme développé par Xavier Vekemans qui avait servi de vérification aux travaux de Mikkel Schierup (voir Schierup 1998). Une gamme de simulations a été définie autour des valeurs de structuration génétique inter-dèmes observée chez le merisier aux loci microsatellites. Les distributions des fréquences alléliques ont été étudiées au niveau des dèmes mais aussi au niveau de la population globale.

Nous nous sommes servis des données accumulées au locus du GSI dans nos 3 populations pour confronter les résultats obtenus par simulation à une réalité biologique. Pour ce faire, nous avons réalisé des échantillonnages des simulations identiques à ceux réalisés dans nos populations. Les distributions des fréquences alléliques des données observées et théoriques ont été comparées à l'aide de tests de Kolmogorov-Smirnov.

Exploration des valeurs de migration efficace aboutissant au rejet de l'isoplèthie

A partir des simulations, nous avons exploré les valeurs de structuration génétique aboutissant au rejet de l'isoplèthie au sein des dèmes et à l'échelle de l'espèce. L'objectif de ce travail est d'énoncer des prédictions quant aux valeurs de migration efficaces observées aux loci neutres permettant de rejeter l'isoplèthie des fréquences alléliques.

Pour chaque valeur de Nm , nous avons généré 1000 échantillons de 30 et 120 individus à partir des distributions des fréquences alléliques obtenues par simulations. Sur chacun de ces échantillons, nous avons testé l'isoplèthie en utilisant la méthode statistique de Davies (Campbell & Lawrence 1981). Cette méthode inspirée de Mantel (1974) consiste à tester l'égalité des fréquences des allèles S à l'aide d'un χ^2 à $(n-1)$ degrés de liberté :

Table 3: Présence des allèles S dans les populations étudiées et fréquences alléliques comparées à celles espérées à l'équilibre sous les hypothèses de Wright (1939) ($\overline{f_{q(eqWright)}}$). n/n_t désigne la proportion d'allèles S détectés dans cette population par rapport au nombre d'allèles S actuellement connu au niveau de l'espèce entière ($n_t=19$). Les fréquences alléliques en populations adultes sont présentées avec (AD) et sans (SD) prendre en compte les répétitions des génotypes dues à la propagation asexuée.

| Allèle S | Comté | | Pagny | | St-Gobain | | Descendants 2002 (N=834) |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|--------------------------------|
| | AD | SD | AD | SD | AD | SD | |
| S ₁ | 0,140 | 0,172 | nd | | 0,090 | 0,084 | 0,082 |
| S ₂ | 0,050 | 0,063 | 0,125 | 0,111 | 0,053 | 0,080 | 0,069 |
| S ₃ | 0,140 | 0,094 | 0,192 | 0,185 | 0,051 | 0,062 | 0,060 |
| S ₄ | nd | | nd | | 0,002 | 0,004 | 0,001 |
| S ₅ | nd | | nd | | nd | | 0,002 |
| S ₆ | 0,070 | 0,047 | 0,048 | 0,056 | 0,031 | 0,049 | 0,053 |
| S ₇ | 0,110 | 0,109 | 0,144 | 0,130 | 0,151 | 0,137 | 0,149 |
| S ₉ | nd | | nd | | 0,002 | 0,004 | 0,004 |
| S ₁₀ | 0,070 | 0,078 | nd | | 0,157 | 0,093 | 0,138 |
| S ₁₂ | 0,110 | 0,141 | nd | | 0,071 | 0,102 | 0,080 |
| S ₁₃ | 0,010 | 0,016 | nd | | 0,045 | 0,066 | 0,023 |
| S ₁₄ | 0,130 | 0,109 | 0,192 | 0,185 | 0,053 | 0,066 | 0,068 |
| S _{x/16} | nd | | nd | | 0,012 | 0,018 | 0,020 |
| S ₁₇ | 0,060 | 0,063 | 0,019 | 0,019 | 0,004 | 0,009 | 0,011 |
| S ₁₈ | 0,060 | 0,063 | 0,135 | 0,130 | 0,057 | 0,049 | 0,027 |
| S ₁₉ | 0,030 | 0,031 | 0,087 | 0,130 | 0,027 | 0,031 | 0,031 |
| S ₂₀ | nd | | 0,038 | 0,037 | 0,180 | 0,124 | 0,152 |
| S ₂₁ | nd | | 0,019 | 0,019 | 0,002 | 0,004 | 0,004 |
| S ₂₂ | 0,020 | 0,016 | nd | | 0,012 | 0,018 | 0,026 |
| n/n_t | 0,684 | | 0,526 | | 0,947 | | 1,000 |
| $\overline{f_{q(eqWright)}}$ | 0,077 | | 0,100 | | 0,056 | | 0,053 |

nd : allèle S non détecté dans cette population

Table 4 : Présentation des allèles S connus et taille des produits PCR obtenus à partir des 3 paires d'amorces consensus.

| Allèle S | Taille du produit PCR du 1 ^{er} intron (PaConsI-F + -R) | Taille du produit PCR du 2 nd intron (PaConsII-F + -R) | Taille du produit PCR du 1 ^{er} intron (PaConsI-F' + -R2, séquenceur capillaire) | Références |
|-------------------|---|--|--|---|
| S ₁ | 456 | 874 (+ ~800) | 380 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₂ | 419 | 2,204 (+ ~1,800) | 345 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₃ | 303 | 898 (+ ~825 + ~950) | 234 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₄ | 523 | 1,064 (+ ~950 + ~1,200) | 451 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₅ | 462 | 2,159 + ~1,650 | 393 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₆ | 518 | 577 | 443 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₇ | 420 | 2,385 (+ ~1,850) | 345 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₉ | 428 | 798 | 356 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₁₀ | 439 | 734 | 364 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₁₂ | 420 | 1,773 (+ ~1,500) | 346 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₁₃ | Non amplifié | 874 (+ ~490 + ~330) | 452, 454 ou 458 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₁₄ | 407 | 719 | 334 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S _{x/16} | 485 | 1,454 | 413 | Sonneveld et al. (2003 ; <i>sous presse</i>) |
| S ₁₇ | ~460* | 788 (772-773-778-795-797-798-805) | 396 | De Cuyper et al. (2005) |
| S ₁₈ | ~410* | 935 (932-934-936-937) | 342 | De Cuyper et al. (2005) |
| S ₁₉ | ~510* | 971 (971) | 427 | De Cuyper et al. (2005) |
| S ₂₀ | ~390* | 1736 (1724-1735-1748) | 326 | De Cuyper et al. (2005) |
| S ₂₁ | ~460* | 2010 (2006-2014) | 375 | De Cuyper et al. (2005) |
| S ₂₂ | ~480* | 2264 (2258-2270) | 422 | De Cuyper et al. (2005) |

* Tailles constatées après mise au point puis vérification avec des allèles de référence (prêtées par De Cuyper) sur notre matériel.

$$\chi^2_{(d.f.,n-1)} \underset{(Davies)}{=} \frac{(n-1) \left(\sum_{i=1}^n (C_i^2) - \frac{4r^2}{n} \right)}{2r - \frac{4r}{n}}$$

où n correspond au nombre d'allèles S, C_i la fréquence absolue du $i^{\text{ème}}$ allèle et r la taille de l'échantillon.

Déviations des distributions de l'hypothèse d'isopléthie

Nous avons testé l'isopléthie des fréquences alléliques observés au locus du GSI de nos 3 populations de merisiers en utilisant la méthode statistique de Davies (Campbell & Lawrence 1981).

C). Résultats et discussion

Les trois populations présentent un grand nombre d'allèles S parmi les 22 allèles reconnus et publiés (Sonneveld *et al.* 2003 ; De Cuyper *et al.* 2005). La population de St-Gobain porte près de 82% des allèles S connus chez *P. avium* L. Chacune des trois populations étudiées présente une bonne partie des d'allèles actuellement connus chez le merisier (Tables 3 et 4).

Les fréquences des allèles S par population diffèrent de fréquences isoplèthes ($\chi_{(17)}^2=498.0$, $P < 5.08 \cdot 10^{-95}$). Lorsqu'on ne tient pas compte des répétitions de génotypes dues au drageonnage, les fréquences alléliques diffèrent toujours de fréquences isoplèthes ($\chi_{(17)}^2=125.4$, $P < 1.42 \cdot 10^{-18}$). Celles-ci ne présentent pas sous la forme de courbe en cloche autour d'une valeur modale $1/n$ où n serait le nombre d'allèles du GSI dans la population (Annexe 6, Figure 3). D'après le test de Davies (Campbell & Lawrence 1981) nos 3 populations de merisiers présentent des fréquences alléliques au locus du GSI qui diffèrent de ce qu'on attend à un locus sous sélection balancée.

Distributions attendues des fréquences des allèles S en population structurée

Nous avons utilisé les estimations de migration obtenues à partir des valeurs de structuration génétique observées au niveau des loci microsatellites non liés au GSI sur les trois populations précédemment décrites pour calibrer le programme de simulation. Les résultats des simulations sont présentés Annexe 6, Table 1. Concernant la forme des distributions alléliques (Annexe 6, Figures 1 et 2), nous obtenons des résultats similaires à ceux présentés par Schierup (1998). Aucune des distributions des fréquences alléliques obtenues par simulation sous quelque Nm que ce soit n'est statistiquement assimilable à celle des fréquences

alléliques observées à St-Gobain chez les merisiers. Les D_{max} calculés entre les distribution moyenne des simulations et les distributions des fréquences alléliques observées ($0,38 < D_{max} < 0,79$) sont toujours supérieurs au 95^{ème} percentile du D_{max} entre les distributions des simulations ($D_{max(simu)} < 0,27$). Cependant, d'après la statistique du test de Kolmogorov-Smirnov, la distribution simulée s'approchant le plus de la distribution observée est celle obtenue pour une migration observée à un locus neutre de $Nm=3$. Le fait que les distributions simulées pour des valeurs de $Nm=3$ ne soient statistiquement pas assimilables aux distributions observées provient probablement d'une divergence d'effectifs pour le calcul des distributions simulées ($N=120$) et des distributions observées ($N=113$).

Exploration des valeurs de migration efficace aboutissant au rejet de l'isoplèthie

Au niveau du dèmes, la probabilité de rejeter l'isoplèthie des fréquences alléliques croît de $Nm \leq 0,1$ à $Nm=0,5$ (structuration forte), puis décroît de $Nm=0,5$ à une structuration inter-dèmes négligeable ($Nm > 50$). Au niveau de l'espèce, les tests montrent que lorsque la structuration inter-populations augmente, la probabilité de rejeter l'isoplèthie des fréquences alléliques augmente. Les tendances de ces tests soutiennent les explications discutées par Schierup (1998). Pour des structurations inter-dèmes fortes, la migration n'est pas assez efficace pour apporter suffisamment d'allèles par génération. Au niveau du locus du GSI, ces dèmes fonctionnent alors comme des unités indépendantes. De fait, au sein de chaque dème, l'équilibre des fréquences alléliques S prédite par Wright en population finie (1939) peut donc être atteint. Pour des valeurs de structurations génétiques faibles, les dèmes ont suffisamment de migrants par génération pour que leur fonctionnement s'approche de celui d'une grande population composée de tous les dèmes (en un pseudo-super-dème). De fait, l'espèce fonctionne alors comme une grande population de taille finie (égale à la somme de la taille des dèmes) et peut donc atteindre et stabiliser l'ensemble des fréquences de ses allèles S autour de la valeur d'équilibre prédite par Wright en population finie (1939). Entre ces deux situations, la migration à chaque génération approvisionne trop chaque dème en allèles nouveaux pour que tous les allèles d'un dème présente une fréquence proche de celle de l'équilibre prédit par Wright (1939). Cependant, cette migration n'est pas suffisante pour uniformiser la diversité génétique de tous les dèmes. La diversité génétique maintenue à chaque dème est suffisamment indépendante de celle des autres dèmes pour développer des particularités endémiques (soit en terme de présence d'allèles soit en terme de fréquences alléliques).

Cependant, le test de Davies (Campbell & Lawrence 1981) présente un problème majeur mis en évidence par nos résultats : cette méthode semble plus sensible à la taille de l'échantillon testé qu'aux valeurs de Nm . Par conséquent, il rejette presque toujours l'isoplèthie des fréquences alléliques S lorsque l'échantillon est grand, même dans les cas les plus plausibles. Nos résultats nous permettent donc de mettre en garde la communauté scientifique quant à l'utilisation de cette méthode déjà utilisée dans plusieurs papiers précédemment publiés (Campbell & Lawrence 1981 ; Lawrence 2000 ; Castric & Vekemans 2004). Nous avons pour perspective de proposer d'autres méthodes qui permettraient de tester l'isoplèthie des fréquences des allèles S et ainsi de pouvoir appréhender et tester le fonctionnement génétique d'un dème ou d'un ensemble de dème à un locus sous sélection balancée.

La structuration génétique des populations en dèmes peut faire dévier les distributions des fréquences alléliques d'un locus sous sélection balancée, le locus du GSI, de celles attendues sous les hypothèses de Wright (1939). Chez le merisier, les distributions des fréquences alléliques du locus du GSI présentent en population plus d'allèles à des fréquences alléliques faibles que ce que prédit le modèle de Wright (1939). Ce biais pourrait s'expliquer par une différenciation inter-populationnelle que Schierup (1998) qualifie d'intermédiaire reflétant le fait que les populations présenteraient une diversité allélique endémique suffisamment mobile du fait de la migration pour se diffuser dans d'autres dèmes mais pas assez mobile pour uniformiser la diversité génétique de l'ensemble des dèmes.

Pour conclure ce chapitre...

Nos résultats montrent que l'utilisation de stratégies de reproduction mixtes chez des arbres peut avoir des conséquences sur l'état et la structuration de sa diversité génétique « neutre » et au locus du GSI.

La prise en compte des ramets issus de la reproduction asexuée modifie les valeurs des indices de fixation. Au sein d'une même population, la propagation asexuée a pour effet d'augmenter les fréquences alléliques de certains allèles. Par contre, les génotypes se propageant partiellement par voie asexuée ne semblent pas plus hétérozygotes que les génotypes non clonaux. Par conséquent, lorsqu'on prend en compte les répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée pour le calcul des F_{IS} , ceux-ci présentent globalement des excès d'hétérozygotes significatifs. Par ailleurs, la propagation asexuée ne favorise pas la présence

des mêmes allèles d'une population à une autre. En conséquence, les différenciations inter-populations sont plus grandes lorsqu'elles sont calculées en tenant compte de tous les ramets. Concernant le GSI, nos données confirment les résultats théoriques obtenus par Glémin *et al.* (2001). Ce locus n'a pas d'influence sur les loci neutres non liés. Par contre, il semble influencer sur la structuration d'un locus qui lui est physiquement lié (2 cM). De fait, on observe à ce locus des excès d'hétérozygotes proches de ceux trouvés au locus du GSI. Par ailleurs, la sélection fréquence-dépendante négative qui devrait être liée au fonctionnement du GSI semble influencer la mobilité des allèles S. Ceux-ci ont une structuration inter-populationnelle plus faible que celle trouvée chez les allèles des loci microsatellites. Par ailleurs, il semblerait que le GSI entraîne le locus neutre qui lui est lié (2 cM). Celui-ci montre une différenciation inter-populations très proche de celle observée au locus du GSI.

Enfin, la distribution particulière des fréquences alléliques d'un locus sous sélection balancée, le locus du GSI, semble confirmer que les populations de merisier en France présentent des différenciations génétiques intermédiaire. On observe plus d'allèles S à faible fréquence que ce que prédit le modèle de Wright (1939). Ceci serait dû à une migration suffisamment faible pour maintenir un endémisme de la diversité génétique mais aussi suffisamment forte pour que nous observions les effets d'un brassage d'allèles entre populations.

Enfin, même si le fait de combiner propagation partielle par voie asexuée et reproduction sexuée sous contrôle d'un système d'auto-incompatibilité est probablement un trait courant chez les plantes (Richards 2003 ; Barrett *com.pers.*), nous manquons de connaissances théoriques et empiriques qui nous permettraient de comprendre comment ces deux traits influencent, séparément et conjointement, la diversité génétique et sa structuration au sein de ces espèces.

Chapitre II



La fée des merisier, un des symboles de la culture anglo-saxonne, reconvertie en fée Clochette par James M. Barrie (...et spécialement kitchisé par des spécialistes pour cette thèse).

CHAPITRE II : IMPACT DU SYSTEME DE REPRODUCTION ET DES FACTEURS ECOLOGIQUES SUR LE SUCCES REPRODUCTEUR INDIVIDUEL CHEZ *PRUNUS AVIUM* L.

INTRODUCTION

Les succès de reproduction sont connus pour varier en fonction des conditions environnementales (Vellend 2005 ; Jacquemyn *et al.* 2006), de la répartition spatiale des individus d'une même espèce (Kokko & Rankin 2006) et des caractéristiques phénotypiques individuelles (Jordano 1993 ; Oddou-Muratorio *et al.* 2005).

Quelques études montrent ainsi un effet potentiel de la compétition interspécifique sur les succès reproducteurs individuels (Caruso 1999 ; Bell *et al.* 2005). Cependant, du fait de sa floraison précoce et riche en composées azotées indispensables au développement post-hivernal de nombreux insectes (Pesson & Louveaux 1984), le merisier est peu sujet à la compétition interspécifique.

Par contre, cette espèce présente la particularité de rarement constituer l'espèce majoritaire des forêts européennes. Elle se rencontre le plus souvent à l'état disséminée au sein de peuplements constitués majoritairement d'espèces dites sociales (chênes, hêtres,...). Les individus poussent alors en taches ou *patches* plus ou moins denses et plus ou moins distants d'arbres congénères. Traditionnellement, on attend que l'augmentation de la démographie d'une population ou de sa densité entraîne une diminution de la fécondité des individus qui la compose à cause de l'augmentation des interactions de type compétition intraspécifique. Cependant, en conditions naturelles, de nombreuses espèces de plantes ont plutôt montré un effet contraire, mettant en évidence une relation positive entre l'augmentation de la taille et de la densité des populations et les capacités reproductives des individus (Allee 1949 ; Willi *et al.* 2005 et Annexe 2). De fait, chez une espèce disséminée où les individus poussent plus ou moins éloignés de leurs congénères, on s'attend à ce que les individus isolés aient plus de mal à participer à la production de la génération suivante.

Par ailleurs, de nombreuses études ont observé une corrélation significative des succès reproducteurs individuels avec les variations des caractéristiques phénotypiques. Ainsi, chez les arbres, la hauteur du tronc ou encore leur diamètre semble constituer de bons prédicateurs des succès de reproduction individuels (Jordano 1993 ; Oddou-Muratorio *et al.* 2005).

Cette partie a pour objectif de quantifier les variations individuels de participation à la création de la génération suivante afin d'appréhender comment la diversité génétique se transmet d'une génération à autre et quels sont les paramètres influençant sa transmission. Outre les paramètres généraux susceptibles de faire varier les succès de reproduction décrits ci-dessus, nous nous intéresserons plus particulièrement aux effets des stratégies de reproduction individuelles sur le succès des composantes mâle et femelle de la reproduction en relation avec les caractéristiques de leur voisinage.

I). PREDICTION THEORIQUE DE L'IMPACT DE LA PROPAGATION ASEEXUEE ET DU GSI SUR LES COMPOSANTES FEMELLES ET MALES DES SUCCES REPRODUCTEURS INDIVIDUELS

A). Effets attendus de la propagation asexuée sur les succès reproducteurs individuels lors des phases de reproduction sexuée avec GSI

Du fait de leur stationnarité, la propagation asexuée chez les plantes a pour conséquence de concentrer la présence d'un génotype dans un espace localement restreint. Les génotypes qui drageonnent forment alors des taches plus ou moins cohérentes d'individus génétiquement identiques (ramets). Dans le cas d'une espèce qui se reproduit partiellement par voie sexuée sous le contrôle d'un GSI, cette réplification peut avoir des conséquences contradictoires sur les composantes mâle et femelle du succès reproducteur individuel (Charpentier 2001 ; Routley *et al.* 2004).

1). Effets sur la composante femelle du succès reproducteur individuel

Chez les espèces entomophiles, les génotypes se propageant par voie asexuée présentent l'avantage d'augmenter localement leur présence et leur visibilité dans l'espace. D'après la théorie du fourragement optimal (« *marginal value theorem* », Charnov 1976), la promesse d'une ressource à l'abondance localisée peut favoriser l'attraction des pollinisateurs et faire converger leur trajectoire vers le groupe de ramets. De nombreuses études empiriques ont observé une corrélation entre la densité locale de plantes fleurissant, leur capacité à attirer leurs pollinisateurs et leur production de graines (voir travaux cités Annexe 2). L'agrégation spatiale d'individus de la même espèce n'est pas exclusive des génotypes se propageant partiellement par voie asexuée. Cependant, chez une espèce entomophile, auto-incompatible,

forestière et disséminée, la capacité à drageonner pourrait constituer une réponse évolutive aux problèmes liés à l'isolement spatial, notamment inhérent aux événements de colonisation. Dans ce cas, grâce à leur capacité à attirer les pollinisateurs et, ainsi, à favoriser l'apport de pollen allogame, on s'attend à ce que les génotypes à reproduction partiellement asexuée aient une plus forte capacité à transformer leurs fleurs en fruits.

Cependant, l'agrégation locale d'individus portant le même génotype augmente la probabilité de transfert de pollen entre ramets au sein d'une même tache de clone (De Jong *et al.* 1993 ; Harder & Barrett 1995 ; Charpentier 2001). Or chez les espèces auto-incompatibles, les événements géitonogames sont infertiles. Les ramets d'un même genet peuvent diluer l'apport de pollen allogame par du pollen géitonogame et limiter son importation vers les ramets les plus centraux (« *pollen limitation* » voir par exemple Harder & Barrett 1995). Par ailleurs, dans le cas rare de saturation pollinique, la géitonogamie associée aux mécanismes liés au GSI peuvent aboutir au blocage du style par des bouchons de callose et interdire alors aux pollens allogames de féconder l'ovule (De Jong *et al.* 1993). On s'attend donc à ce que l'augmentation du nombre de ramets d'un même genet dans le voisinage d'un arbre diminue la probabilité que ses fleurs soient pollinisées de façon efficace lors de la visite de vecteurs (De Jong *et al.* 1993; Ushimaru & Kikuzawa 1999). Ainsi, il a été montré que, chez certaines espèces, la propagation asexuée associée à un système d'auto-incompatibilité pourrait être à l'origine des faibles taux de fructification observés (Aspinwall & Christian 1992).

2). Effets sur la composante mâle du succès reproducteur individuel

Les individus qui se propagent par voie asexuée augmentent la quantité globale de gamètes mâles produite par leur génotype. Par ailleurs, ils occupent un volume supérieur à celui d'un génotype ne possédant qu'un seul représentant. Par conséquent, leur surface d'interaction avec d'autres génotypes est d'autant plus grande que le genet possède de ramets. Ils ont donc un potentiel de dispersion de pollen plus fort que celui d'un arbre seul. On s'attend donc à ce que ces génotypes émettent plus de gamètes, qu'ils interagissent avec un plus grand nombre de congénères et qu'en résultat, leur contribution à la génération suivante en tant que pères soit plus forte que celle de génotypes constitués d'un seul ramet (Klinkhamer & De Jong 1997 ; Routley *et al.* 2004).

Paradoxalement, la propagation asexuée peut avoir des effets négatifs sur la composante mâle du succès reproducteur. L'augmentation du nombre de fleurs appartenant à un même génotype augmente la probabilité de transfert de pollen géitonogame, et ce d'autant plus lorsque les clones sont agrégés dans l'espace (De Jong *et al.* 1993 ; Harder & Barrett 1995 ;

Eckert *et al.* 2000 ; Reusch 2001). Or la géitonogamie chez cette espèce auto-incompatible a un coût fort sur la composante mâle : la perte d'un gamète. La présence de ramets du même genot à proximité favorise la géitonogamie et diminue l'efficacité de la fonction mâle. Par ailleurs, les individus identiques entourant un arbre peuvent drastiquement diminuer l'efficacité de l'exportation de pollen du génotype. Les pollinisateurs en visitant séquentiellement des fleurs appartenant à un même génotype déposent sur le style de chaque nouvelle fleur du pollen des fleurs visitées précédemment. Une quantité non négligeable de pollen peut donc être ainsi soustrait des vecteurs alors qu'elle aurait pu être exporté et déposé sur les stigmas d'autres génotypes (*pollen discounting*, Harder & Thomson 1989 ; Barrett 2003 ; Porcher & Lande 2005 ; Annexe 2). En conséquence, la propagation asexuée peut potentiellement nuire à l'efficacité du succès reproducteur mâle des génotypes qui drageonnent (Klinkhamer & De Jong 1997).

Les prédictions des effets potentiels de la reproduction asexuée sur le succès reproducteur des individus semblent donc contradictoires. Cependant, on s'attend globalement à ce que la propagation asexuée associée au coût de la géitonogamie infligé par le GSI nuise à chacune des composantes de la reproduction sexuée.

B). Effets attendus du GSI sur la fructification

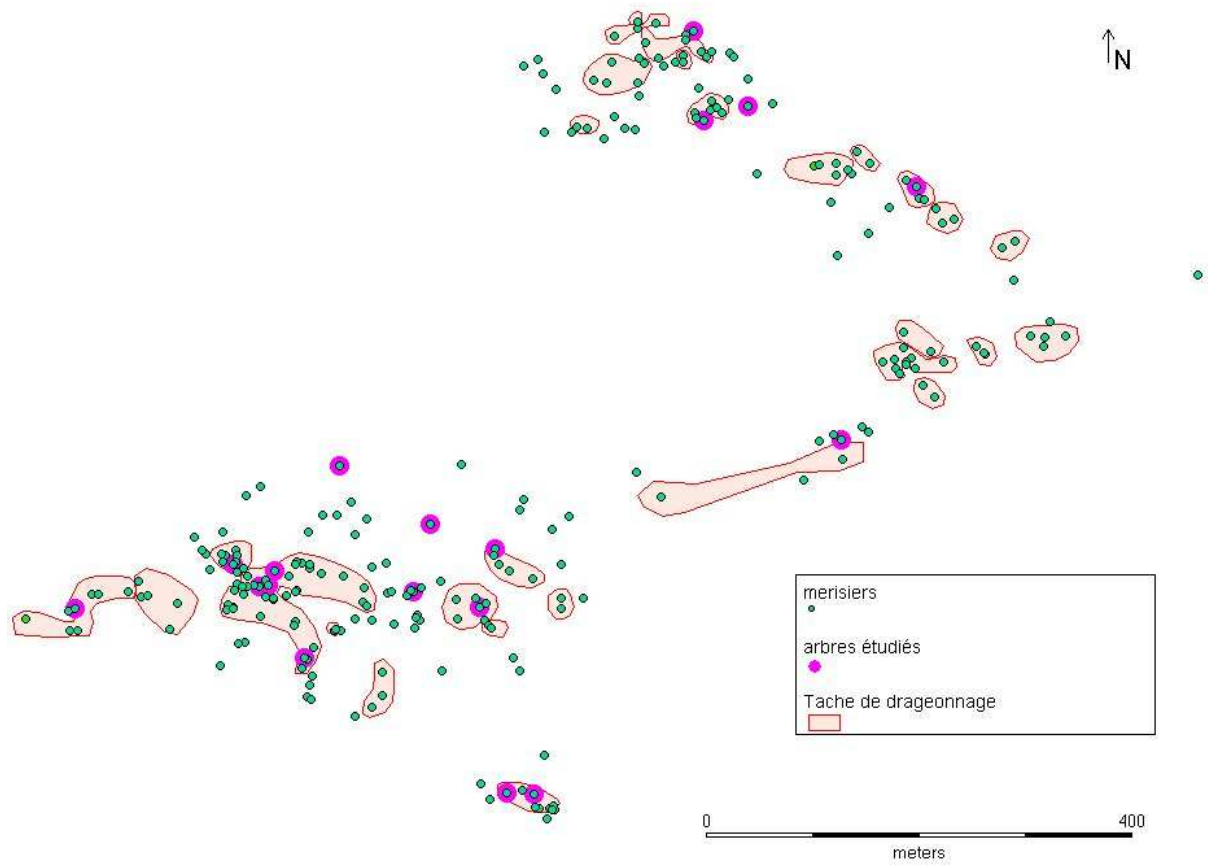
Du fait de la sélection fréquence-dépendante négative, les gamètes porteurs des allèles S les plus rares devraient être capable de féconder un plus grand nombre d'individus et d'être pollinisé efficacement plus souvent par un apport de pollen. On s'attend donc conformément aux prédictions de Wright (1939) que les arbres ayant des allèles S rares produisent plus de descendants que ceux porteurs d'allèles S courants, à la fois pour la composante mâle et femelle. Ils auraient ainsi un meilleur succès de fructification et en tant que pères, ils exporteraient leur pollen de façon plus efficace.

II). DISPOSITIF EXPERIMENTAL ET ECHANTILLONNAGE, LE TEMPS DES MERISES

L'étude a été menée dans la population de St-Gobain, précédemment décrite.

Le succès reproducteur d'un individu inclus non seulement sa production de graines ou le nombre de graines engendré mais aussi la capacité de survie et le succès reproducteur de ces mêmes graines. Cependant, nous nous intéresserons dans cette partie uniquement à la capacité des individus à produire des graines, c'est-à-dire des descendants en début de vie ayant peu subi les contraintes environnementales liées au développement et à la survie d'un arbre en

Figure 7: Carte des positions des arbres ayant servi à l'étude des succès individuel de fructification.



forêt. Pour plus de lisibilité dans ce manuscrit, nous appellerons cette capacité à produire des graines « succès reproducteur » ou « succès de reproduction »

A). Caractéristiques phénotypiques et génétiques des arbres de la population de St-Gobain

Nous avons utilisé les informations génétiques acquises précédemment à l'aide des 8 marqueurs microsatellites et du locus du GSI pour caractériser les arbres adultes de la population. Par ailleurs, pour chaque arbre, nous avons relevé sa hauteur (du sol à la tête du houppier) et le diamètre de son tronc à 1,30m du sol. Les distances entre arbres ont été calculées à partir des coordonnées GPS de la position de chaque arbre (Figure 7).

B). Estimation de la composante femelle du succès reproducteur individuel

Pour plus de facilité, nous appellerons « *succès de fructification* » la proportion de fleurs pollinisées aboutissant à la formation d'un fruit à noyau lignifié.

Nous avons choisi 21 arbres mères dans la population en fonction de leur caractère isolé ou groupé, de leur appartenance ou non à une tache de drageonnage et en fonction de l'accessibilité de leur houppier à la grimpe (voir Annexe 3, Figure 1). Sur chacun de ces arbres nous avons choisi une branche rayonnant du tronc vers l'extérieur du houppier. L'utilisation des techniques de l'Accrobranche® nous a permis de prendre position à la hauteur des branches étudiées pour y compter avec précision les fleurs puis les fruits, sans avoir à y prendre appui. Nous avons donc dénombré toutes les fleurs d'une ou de deux branches par arbre au mois d'avril 2004. Les branches étaient alors marquées avec un ruban de plastique et de la peinture au niveau du tronc et la position de toutes fleurs comptées était reportée sur un plan schématisant chaque branche étudiée. Deux mois plus tard, mi-juin, nous sommes revenus compter les fruits qui s'y sont formés, peu de temps avant leur maturation (fruits globalement encore verts mais pleinement formés).

Nous avons par ailleurs suivi deux années consécutives (2003 & 2004) les périodes et l'avancée de floraison de chacun des 247 arbres.

1). Analyse des facteurs influençant potentiellement la composante femelle des succès reproducteurs individuels

Pour estimer les effets respectifs de la propagation asexuée, du GSI, des caractéristiques phénotypiques de l'arbre comparées à celles de son voisinage et leur structure spatiale, nous

avons synthétisé ces effets en 12 variables incorporées dans un modèle de régression multiple. Le problème de ce genre d'analyse consiste à déterminer quelle taille de voisinage doit être considérée. Nous avons choisi de ne pas fixer cette taille et de regarder les effets des différents paramètres à toutes les tailles de voisinage possibles pour chaque arbre.

$$\sqrt{\left(\frac{Fr}{F}\right)} = mDist(x) + \text{var } Dist(x) + nC(x) + nCA(x) + mDistCA(x) + \text{var } DistCA(x) + nH(x) + mDistH(x) + \text{var } DistH(x) + nD(x) + mDistD(x) + \text{var } DistD(x)$$

où $\sqrt{\left(\frac{Fr}{F}\right)}$ correspond à la racine carrée de la proportion de fleurs pollinisées en fruits par arbre, $mDist(x)$ à la distance moyenne séparant un arbre de ses x plus proches voisins et $\text{var } Dist(x)$ à la variance de cette distance, $nC(x)$ au nombre de clones parmi les x plus proches voisins, $nCA(x)$ au nombre d'allèles S compatibles, $mDistCA(x)$ à la distance moyenne séparant l'arbre étudié des $nCA(x)$ et $\text{var } DistCA(x)$ sa variance, $nH(x)$ le nombre de voisins plus haut que l'arbre étudié, $mDistH(x)$ la distance moyenne séparant l'arbre étudié de ses $nH(x)$ et sa variance $\text{var } DistH(x)$, $nD(x)$ le nombre d'arbres de plus gros diamètre que l'arbre étudié, $mDistD(x)$ la distance moyenne des arbres de plus gros diamètre et $\text{var } DistD(x)$ la variance de cette distance. Toutes les variables sont elles-mêmes fonction du nombre considéré de voisins les plus proches de l'arbre étudié^(x). Les régressions multiples correspondant aux 246 tailles de voisinage possibles ont été réalisées à l'aide de la procédure GLM implémentée sous SAS v8.2 (SAS Institute Inc.).

C). Estimation de la composante mâle du succès reproducteur individuel

Afin d'étudier la composante mâle du succès reproducteur des merisiers de la population de St-Gobain, nous avons récolté en 2002, 941 descendants sur 24 mères et en 2003, 887 descendants sur 32 mères (Annexe 7). Les merises ont été récoltées au début du mois de juin, en fin de maturation, encore portées par leurs mères. Une ou plusieurs branches par arbre étudié étaient tirées au fusil. Cette méthode malheureusement invasive permettait cependant de garantir l'identification de la mère pour chacun des descendants. Immédiatement après

récolte, les merises étaient identifiées puis conservées dans un récipient portatif refroidi à l'azote liquide jusqu'au laboratoire.

Les embryons de descendants étaient ensuite extraits de leur noyau puis de leurs membranes maternelles. Leurs ADNs étaient alors extraits puis génotypés à l'aide de 7 marqueurs microsatellites identiques au set utilisé pour les adultes mais sans le marqueur UDP98-412. Les descendants étaient sexuellement typés à l'aide des mêmes marqueurs du locus du GSI.

A partir des génotypes obtenus, nous avons effectué une analyse de recherche de paternité. Pour ce faire, nous avons choisi d'attribuer les paternités de façon catégorique à l'aide d'une méthode de recherche de paternité par maximum de vraisemblance (Meagher 1986 ; Marshall *et al.* 1998 ; Slate *et al.* 2000) et d'utiliser le logiciel CERVUS v2.0 (Marshall *et al.* 1998). Cependant, le modèle implémenté dans CERVUS v2.0 permet de prendre en compte uniquement des marqueurs co-dominants à ségrégation mendélienne. De ce fait, il exclut l'utilisation de l'information fournie par le génotypage du locus du GSI. Or nous ne pouvions ignorer cette information lors de l'analyse de paternité. C'est pourquoi, suite à l'attribution de paternité sur la base des 7 marqueurs microsatellites, nous avons vérifié que les pères attribués par CERVUS portaient l'allèle S attendu. Une section des résultats présente le bilan de l'apport du locus du GSI dans l'analyse de paternité.

1). Analyses de dispersion du pollen efficace et nombre de pères efficaces par mère

A partir de l'analyse de paternité et des positions GPS, les distances minimales parcourues par le pollen efficace ont été classifiées afin de visualiser la propagation du pollen des merisiers en conditions forestières. Par ailleurs, afin de quantifier la polygamie et ses variations interindividuelles chez cette espèce, nous avons calculé le nombre de pères pollinisant de façon efficace chacune des mères récoltées. Pour chacune des mères, nous avons calculé un nombre efficace de père (N_e).

$$N_e = \frac{1}{n_{p/j} \sum_{i=1} f_i^2}$$

où f_i^2 correspond à la fréquence de pollinisation du père i sur la mère j et $n_{p/j}$ le nombre de pères identifiés comme pollinisateurs efficaces de la mère j

2). Analyse des facteurs influençant potentiellement la composante mâle des succès reproducteur individuel

Pour quantifier les effets respectifs des caractéristiques phénotypiques, de la propagation asexuée et du GSI sur les succès reproducteurs mâles des pères de la population, nous avons utilisé deux modèles de régression multiples.

Le premier a permis d'analyser l'influence respective de la distance minimale séparant le père de la mère (D_{P-M}) et des fréquences alléliques du GSI dans la population de parents ($FqAl_{(S)}$) sur le succès de pollinisation ($FqPOL_{(S)}$) de chaque allèle (S).

$$FqPOL_{(S)} = D_{P-M} + FqAl_{(S)}$$

Le second a permis d'analyser l'influence des caractéristiques phénotypiques intrinsèques de la mère et du père ainsi que de la distance les séparant (D_{P-M}) sur le nombre de descendants laissé par père sur chaque mère ($SuccèsPère / Mère$).

$$SuccèsPère / Mère = D_{P-M} + nCP + nCM + HP + HM + DP + DM$$

où nCP et nCM correspondent aux nombres respectifs de ramets par genot chez le père et chez la mère, HP et HM à leurs hauteurs, DP et DM à leur diamètre.

III). FLORAISON, FRUCTIFICATION ET FLUX DE POLLEN EN POPULATION

Les 247 arbres adultes de la population de St-Gobain se sont couverts massivement de fleurs durant les deux années du suivi de floraison. Chacune de ces deux années, ils ont été les premiers arbres entomophiles à fleurir en forêt de St-Gobain sur les parcelles étudiés. Tous les arbres ont eu au moins une semaine commune de floraison avec des arbres d'autres génotypes. Les arbres globalement fleurissent ensemble même si certains génotypes semblent plus rapides que d'autres à se couvrir de fleurs ou à stopper leur floraison.

A). Succès de fructification

Les deux années du suivi de floraison, au mois de juin, tous les arbres présentaient une fructification très éparse et peu abondante. Par ailleurs, il nous semblait que certains arbres fructifiaient plus que d'autres.

En 2004, les 21 arbres étudiés ont présenté en moyenne 1180 ± 435 fleurs par branche mais seulement 39 ± 59 fruits deux mois plus tard (voir Annexe 3, Table 1). La proportion de fleurs transformée en fruits variait de 0 fruits pour 100 fleurs à 14 fruits pour 100 fleurs. Par ailleurs, nous avons observé un petit nombre de merises qui se présentaient sous la forme d'un

Table 5 : Influence des caractéristiques intrinsèques des porte-graines sur leur succès de fructification.

R^2 ajusté=0,041, $F_{(5,15)}= 1,1701$, $p<0,36873$, Ecart-type de l'Estimation=0,09815.

| | β | Ecart-type(β) | $t_{(15)}$ | niveau p |
|------------------------------------|---------|-----------------------|------------|-------------|
| OrdOrig. | | | -0,155 | <i>n.s.</i> |
| Hauteur de l'arbre | 0,462 | 0,280 | 1,649 | <i>n.s.</i> |
| Diamètre du tronc de l'arbre | -0,296 | 0,292 | -1,013 | <i>n.s.</i> |
| Nombre de ramets du genet maternel | -0,084 | 0,238 | -0,353 | <i>n.s.</i> |
| Fq_{SI1} | 0,332 | 0,277 | 1,197 | <i>n.s.</i> |
| Fq_{SI2} | 0,001 | 0,288 | 0,005 | <i>n.s.</i> |

pédoncule reliant un noyau pas encore lignifié, desséché et noirci présentant parfois encore des restes de pièces florales pourrissantes. Ces merises n'ont bien entendu pas été prises en compte dans le dénombrement des succès de fructification.

Le modèle général des régressions multiples n'a pas donné de résultats significatifs pour toutes les tailles de voisinage considérées. Cependant les tendances obtenus en « condition naturelle » pour chaque paramètre testé apportent des résultats aux questions posées.

1). Effets de la propagation asexuée sur la fructification

Le nombre de ramets produit par le genet maternel ne semble pas influencer les succès de fructification (Table 5). Cependant, 97% des tailles de voisinage montrent que lorsque la proportion de ramets du genet d'un arbre augmente dans son voisinage, son succès de fructification tend à diminuer, parfois de façon significative (voir Annexe 3, Table 2).

2). Effets du GSI sur la fructification

Au niveau de la population globale, les fréquences des allèles S des mères dans la population totale ne semblent pas influencer leur succès de fructification (Table 5). Par ailleurs, le nombre d'allèles compatibles disponible dans le voisinage ne semble pas clairement influencer sur le succès de fructification des arbres étudiés (Annexe 3, Table 2). Par contre, la distance moyenne des allèles S compatibles parmi les voisins semble avoir une influence sur le succès de fructification. Plus de 80% des tailles de voisinage considérées et tous les résultats significatifs montrent que plus la distance moyenne des allèles S compatibles augmente, meilleur est le succès de fructification. Enfin, plus de 60% des tailles de voisinage et tous les résultats significatifs montrent que la fructification semble meilleure lorsque la variance de la distance séparant les arbres étudiés des allèles S compatibles disponibles parmi le voisinage augmente.

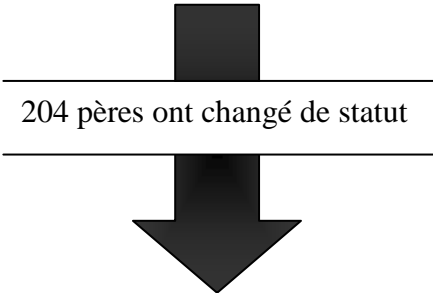
Par ailleurs, nous avons mis en évidence des effets de la structure spatiale de la répartition de l'espèce sur les succès de fructification. D'après nos résultats (Annexe 3, Table 2), l'agrégation spatiale des merisiers favorise la proportion de fleurs pollinisée aboutissant à la formation d'un fruit. De même, lorsque la proportion de voisins de plus gros diamètre augmente dans le voisinage d'un arbre, sa fructification tend à être meilleur. A l'inverse, lorsque le nombre de voisins de plus grande taille augmente dans le voisinage d'un arbre, sa capacité à produire des fruits à partir de ses fleurs tend à être plus faible.

Table 6 : Résultats de l'analyse de paternité sur les descendants 2002. Les résultats présentés par mère regroupent le nombre de descendants récoltés, dont l'ADN a été extrait $N_{(graines\ récoltées)}$, le nombre de descendants dont le génotype complet est connu actuellement $N_{(génotypés)}$, le nombre de pères intra-population identifiés comme pollinisateurs de cette mère N_p et N_{ep} , le nombre efficace de pères en résultant.

| Nom de la mère | $N_{(graines\ récoltées)}$ | $N_{(génotypés)}$ | N_p | N_{ep} |
|----------------|----------------------------|-------------------|---------|----------|
| 143p | 35 | 14 | 8 | 6,53 |
| 146p | 36 | 22 | 9 | 4,32 |
| 149p | 57 | 20 | 15 | 11,76 |
| 156p | 60 | 22 | 13 | 5,90 |
| 169p | 37 | 19 | 14 | 11,65 |
| 176p | 19 | 8 | 6 | 4,57 |
| 177p | 27 | 12 | 10 | 8,00 |
| 206p | 68 | 36 | 18 | 12,23 |
| 216p | 60 | 24 | 12 | 9,00 |
| 240p | 18 | 4 | 2 | 1,60 |
| 251p | 24 | 8 | 4 | 3,56 |
| 256p | 38 | 23 | 11 | 6,70 |
| 258p | 31 | 12 | 10 | 5,88 |
| 266p | 31 | 17 | 8 | 4,98 |
| 268p | 28 | 23 | 11 | 6,53 |
| 277p | 26 | 6 | 4 | 3,60 |
| 282p | 31 | 14 | 9 | 5,44 |
| 289p | 40 | 27 | 9 | 3,94 |
| 309p | 29 | 17 | 9 | 5,67 |
| 322p | 49 | 33 | 15 | 9,64 |
| 349p | 35 | 23 | 12 | 8,97 |
| 363p | 74 | 51 | 19 | 4,06 |
| 377p | 67 | 39 | 15 | 6,42 |
| 384p | 26 | 17 | 13 | 11,56 |
| Moyenne | 39,42 | 20,46 | 10,67 | 6,77 |
| (±écart-type) | (±16,37) | (±11,05) | (±4,26) | (±2,97) |

Figure 8 : Apport du locus du GSI dans l'analyse de paternité.

| | Analyse sous Cervus (7 microsats. uniquement) | Apport du GSI |
|--|--|------------------------------------|
| Père unique au seuil de 95% | 259 | Confirmés 226 |
| | | Exclus 33 |
| Multi-paternité possible, un plus probable à 80% | 326 | Confirmés 195 |
| | | Exclus 102 |
| | | Désigne un unique autre père 29 |
| Multi-paternité, aucun plus probable | 206 | Confirmés 166 |
| | | Désigne un unique autre père 40 |
| Pas de pères identifié dans la population | 150 | Pas d'information |

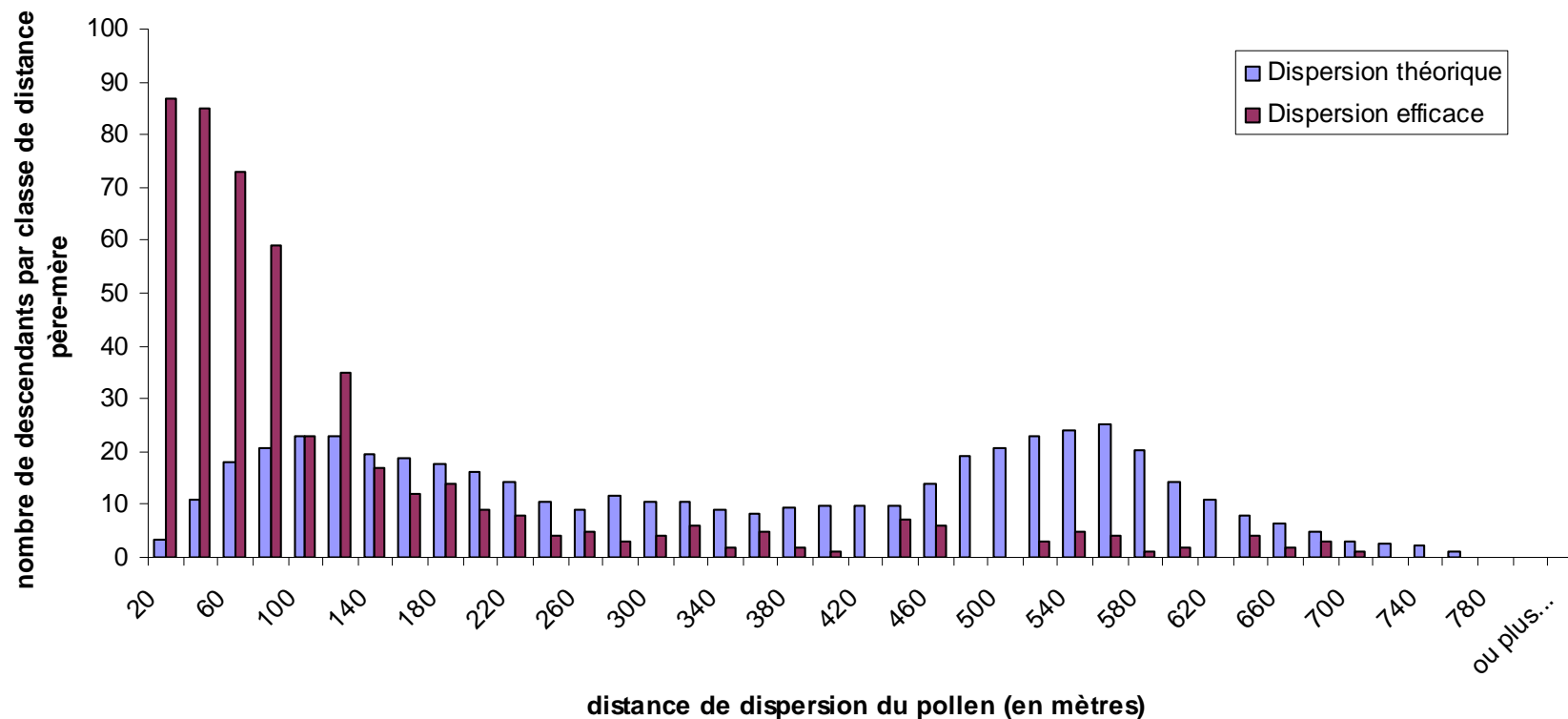


204 pères ont changé de statut

| | | | |
|---|-----|---|----------------|
| Anciens pères uniques au seuil de 95%, impossibles d'après le locus du GSI | 33 | } Erreur de type Ib* (Cryptic gene flow) | 135 (14,4%) |
| Multi-paternité avec un père plus probable à 80%, aucun possible d'après le locus du GSI | 102 | | |
| Multi-paternité avec un père plus probable à 80%, mais le locus du GSI désigne un unique autre père | 29 | → Erreur de type Ia* | 29 (3,1%) |
| Multi paternité aucun plus probable mais le locus du GSI désigne un unique père parmi ceux-ci | 40 | → Erreur de type II* | 40 (4,3%) |

* telles que définies dans Oddou-Muratorio *et al.* (2003).

Figure 9 : Histogramme du nombre d'attributions de paternité en forêt de St-Gobain l'année 2002 en fonction des classes de distance séparant le père de l'arbre mère (pallier de 20m). L'histogramme bleu représente le nombre de croisements théoriquement possibles sans contrainte de distance et proportionnels au nombre de descendants étudiés.



B). Succès de paternité

1). Assignation de paternité

Les résultats des assignations de paternité par méthode de maximum de vraisemblance sont synthétisés Table 6. Un père unique identifié par maximum de vraisemblance et confirmé par le locus du GSI a été trouvé pour 490 descendants sur 941. L'assignation de paternité a donc permis d'identifier les pères de 53% des descendants par mère en moyenne.

2). Apport du locus du GSI

L'apport du locus du GSI est synthétisé Figure 8. Le locus du GSI modifie l'état de paternité attribué uniquement par microsatellites de 204 descendants sur 940 (21,7%). En tenant compte du locus du GSI et du critère statistique utilisé par Cervus v2.0, 490 descendants ont un père unique attribué parmi la population contre 585 d'après les seul 7 microsatellites. 166 descendants ont plusieurs pères possibles contre 206 avec les seuls microsatellites et enfin, 285 descendants proviennent soit d'un père extérieur soit de gamètes mâles porteurs d'allèle(s) e muté(s) provenant de mâles de la population contre 150 identifiés par les 7 microsatellites.

3). Dispersion du pollen et polygamie

Au sein de la population de St-Gobain, le pollen efficace se disperse à une distance moyenne de 116m avec un écart type de 145m (Figure 9). La distance maximale de dispersion de pollen observée sur la population est de près de 694m. 50% des descendants étudiés dont le père a été identifié dans la population ont un père distant de moins de 61 mètres de leur mère. 95% ont un père distant de moins de 485 mètres de leur mère. Le nombre de croisements efficaces observé diminue avec la distance. Jusque 140 m, le nombre de croisements effectivement observé est supérieur aux nombre de croisements attendus si ceux-ci n'était pas dépendants de la distance. Au-delà de 140 m, le nombre de croisements efficaces observés est plus petit que le nombre de croisements espérés sans effet de distance. On remarque cependant l'occurrence d'un nombre de croisements efficaces non négligeables à longue distance. Enfin, un minimum de 27,2% du pollen vient de l'extérieur des parcelles étudiées, soit au delà de 771 mètres.

On observe qu'en moyenne de 10,7 ($\pm 4,3$) pères pollinisent une mère. Cela se traduit par 6,8 ($\pm 3,0$) pères efficaces en moyenne par mère. Le nombre de pères observés par mère augmente significativement lorsqu'on augmente le nombre de descendants analysés par mère ($r_s=0.777$,

Table 7 : Influence de la distance moyenne de dispersion de l'allèle S (\bar{D}_d) et des fréquence de l'allèle S en tenant compte ($Fq_{SI}(AD)$) ou non ($Fq_{SI}(SD)$) des répétitions de génotypes dues à la propagation asexuée sur le succès de pollinisation des allèle S.

R² ajusté=0,504, F_(2,14)=9,1403, p<0,00289, Ecart-type de l'Estimation=0,03243.

| | β | Ecart-type(β) | t ₍₁₄₎ | niveau p |
|---------------|-------------|-----------------------|-------------------|-------------|
| OrdOrig. | | | 0,49390026 | <i>n.s.</i> |
| \bar{D}_d | -0,03990725 | 0,20040729 | -0,19913074 | <i>n.s.</i> |
| $Fq_{SI}(SD)$ | 0,77079808 | 0,20040729 | 3,84615796 | ** |

R² ajusté=0,443, F_(2,14)= 7,3651, p<0,00652, Ecart-type de l'Estimation=0,03438.

| | β | Ecart-type(β) | t ₍₁₄₎ | niveau p |
|---------------|------------|-----------------------|-------------------|-------------|
| OrdOrig. | | | 0,70835094 | <i>n.s.</i> |
| \bar{D}_d | 0,04535841 | 0,20423437 | 0,22209001 | <i>n.s.</i> |
| $Fq_{SI}(AD)$ | 0,69638163 | 0,20423437 | 3,40971815 | ** |

Table 8 : Influence des caractéristiques phénotypiques intrinsèques des arbres impliqués dans la reproduction sexuée sur le nombre de descendants laissés par un père sur chaque mère.

R² ajusté=0,108, F_(7,248)=5,3875, p<,00001, Ecart-type de l'Estimation=0,08748.

| | β | Ecart-type(β) | t ₍₂₄₈₎ | niveau p |
|------------------------------------|---------|-----------------------|--------------------|-------------|
| OrdOrig. | | | 1,897 | * |
| Distance _{père-mère} | -0,280 | 0,060 | -4,705 | *** |
| Nombre de ramets du genot paternel | 0,195 | 0,060 | 3,242 | *** |
| Hauteur du père | -0,061 | 0,071 | -0,860 | <i>n.s.</i> |
| Diamètre du tronc du père | 0,144 | 0,072 | 2,005 | * |
| Nombre de ramets du genot maternel | -0,074 | 0,064 | -1,155 | <i>n.s.</i> |
| Hauteur de la mère | 0,002 | 0,072 | 0,034 | <i>n.s.</i> |
| Diamètre du tronc de la mère | 0,049 | 0,076 | 0,644 | <i>n.s.</i> |

$P < 10^{-5}$). Par contre, le nombre de pères efficaces par mère ne semble pas dépendre du nombre de descendants analysés par mère ($r_s = 0.369$, $P > 0.076$).

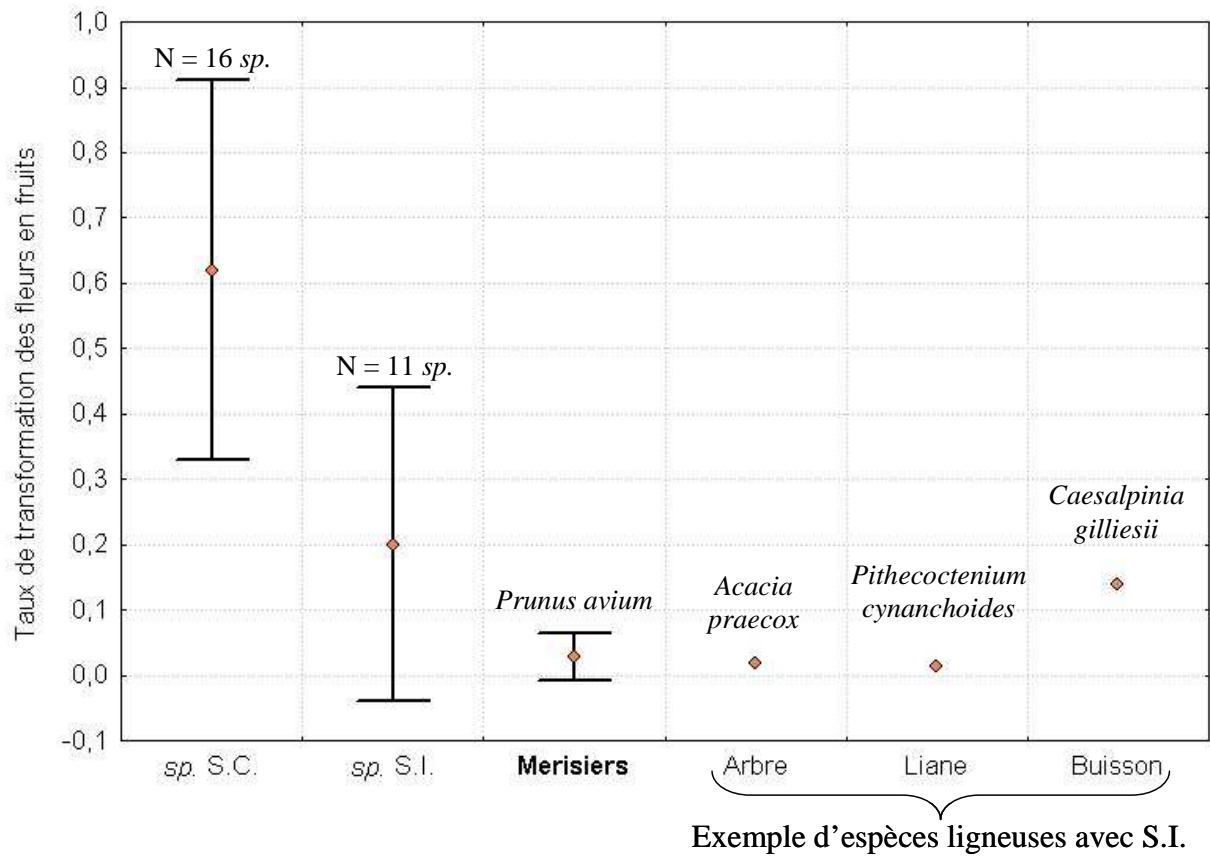
4). Effets de la propagation asexuée et du GSI sur la paternité

Les allèles S (N=10) dont les fréquences alléliques sont inférieures à la valeur attendue à l'équilibre (=1/17) sous les hypothèses de Wright (1939) ne voient pas leur fréquence augmenter plus que celles des allèles S (N=7) dont la fréquence allélique dans la population de parents est supérieure à cette valeur d'équilibre (Wilcoxon-Mann-Whitney, $W = 98.0$, $p = 0,4639$).

D'après les résultats du premier modèle de régression multiple (Table 7), un allèle S donné laisse d'autant plus de descendants à la génération suivante que sa fréquence allélique dans la population de parents, calculées avec et sans les répétitions de génotypes liées au drageonnage, était grande. Par contre, la distance que doit parcourir un pollen porteur d'un allèle S donné pour féconder une mère ne semble pas influencer sur le nombre de descendants que cet allèle S laissera dans la population.

Le second modèle de régression multiple (Table 8) montre que l'augmentation du nombre de ramets par génotype paternel augmente significativement sa capacité à laisser plus descendants par mère. Par ailleurs, le modèle montre que plus un père est proche d'une mère, plus il pollinise de descendants sur cette mère. Enfin, plus le diamètre de tronc à 1,30m du sol du père est grand, plus il fécondera de descendants par mère.

Figure 10 : Comparaison du taux de transformation des fleurs en fruits chez le merisier avec ceux observés chez des plantes auto-compatibles (S.C.) et auto-incompatibles (S.I.). Les données ont été obtenues à partir de l'étude de Morales & Galetto (2003).



IV). DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A). Effet des stratégies de reproduction sur la fructification

D'après nos résultats, les valeurs de fructification sont extrêmement faibles chez le merisier. Ils semblent en effet investir un grand nombre de fleurs dans la reproduction sexuée pour finalement ne produire qu'un nombre restreint de fruits. Cependant, l'étude n'a été menée que sur une année. Nous ne pouvons actuellement dire si ces valeurs sont bien celles qu'on pourrait observer habituellement dans cette population. En effet, comme beaucoup d'arbres (Herrera *et al.* 1998), les merisiers pourraient avoir un cycle de reproduction sexuée alternant des années de fortes fructifications avec de moins bonnes. Comparées aux valeurs de fructification précédemment publiées pour d'autres espèces de *Prunus*, nos valeurs peuvent apparaître comme très faibles. Cependant, contrairement à ces espèces (*P. mahaleb* Jordano 1993 ; *P. virginiana* Parciak 2002 ; Company *et al.* 2005), *P. avium* possède un système d'auto-incompatibilité pleinement fonctionnel : aucun allèle d'auto-compatibilité n'a été observé dans notre population. Par ailleurs, à titre indicatif, les valeurs de fructification des merisiers de St-Gobain sont proches de celles observées par Morales & Galetto (2003) chez une série d'espèces ligneuses à reproduction sexuée contrôlée par un SI (Figure 10).

A partir de ces données, nous nous sommes donc intéressé aux facteurs susceptibles d'expliquer ces taux de fructification à la fois faibles pour l'ensemble de la population mais aussi extrêmement variables d'un individu à l'autre.

1). Effets de la propagation asexuée sur la fructification

Dans notre population et sur un événement de reproduction, le nombre de ramets par genêt quelque soit leur position spatiale par rapport à l'arbre étudié ne semble pas affecter les succès de fructification. Ce résultat est inattendu d'autant plus que d'après certains auteurs (voir les exemples cités dans Bond & Midgley 2003) ont noté une tendance de la part d'arbres se propageant par voie asexuée à moins investir dans la production de descendants par voie sexuée. Par contre, le nombre de ramets du drageon présents dans le voisinage semble affecter le succès de fructification. Ainsi la propagation asexuée diminuerait le succès de fructification d'un arbre lorsque les ramets du même genêt seraient agrégés en taches compactes. Ce résultat pourrait être la mise en évidence d'un effet de pollen limitation chez le merisier généré par l'action conjointe de l'augmentation du nombre de croisements géitonogames liés

à la propagation asexuée et du coût attribué à la géitonogamie par le GSI. Le ramet d'un même genet situé sur le trajet d'un vecteur de pollen agirait comme un filtre aux pollens allogames. Celui-ci serait alors d'autant plus dilué par du pollen géitonogame que le pollinisateur aurait préalablement visité plus de ramet du même genet (De Jong *et al* 1993 ; Routley *et al.* 2004). Chez le merisier, la propagation asexuée aurait donc un effet négatif sur les succès de fructification dont l'intensité dépendrait de la structure spatiale des clones et du nombre de congénères différents poussant à proximité. Cependant, les génotypes qui drageonnent peuvent se maintenir au cours de plusieurs générations d'arbres utilisant uniquement un mode de reproduction sexué (DesRochers & Lieffers 2001; Bond & Midgley 2003). Ils sont donc susceptibles de participer à plus d'évènements de reproduction et de finalement produire en un temps plus long plus de descendants par voie sexuée qu'un génotype ne drageonnant pas. Ainsi, à une échelle de temps supérieur à un évènement de reproduction, le coût de la propagation asexuée sur les succès de fructification pourrait être très faible voire inexistant dans les populations de merisier.

2). Effets du GSI sur la fructification

Les fréquences alléliques des allèles S de la mère ne semblent pas influencer leurs succès de fructification individuels. De même, le nombre d'allèles S compatibles disponibles dans le voisinage ne semble pas influencer sur les succès de fructification des merisiers étudiés. Ces deux résultats convergeant argumentent en faveur du fait que, pour les individus étudiés, le nombre de croisements compatibles disponibles à la reproduction sexuée n'est pas un facteur limitant la fructification. Nos résultats montrent une tendance à confirmer les prédictions discutées par de précédents auteurs (voir par exemple Castric & Vekemans 2004 ; Wang *et al.* 2005) : avec 18 allèles S et malgré des fréquences variables, cette population de merisiers n'expérimente pas de réduction des succès de fructification contrairement à ce qu'ont observé certains auteurs dans des populations comportant seulement deux ou trois types sexuels (voir par exemple Reinartz & Les 1994 ; Kery *et al.* 2003 ; Shibayama & Kadono 2003 ; Brys *et al.* 2004). Les allèles S compatibles semblent suffisamment nombreux et accessibles à la composante femelle des arbres pour que nous ne puissions pas observer l'effet de la sélection fréquence-dépendante négative sur la fructification.

Etonnamment, le modèle montre que la fructification serait meilleure lorsque les allèles compatibles se trouveraient plus éloignés de la mère étudiée. Ce résultat *a priori* paradoxal va à l'encontre des attendus. Cependant, nous interprétons ce résultat comme un effet possible, à tester, d'une forte structuration génétique intra-population. Notre hypothèse est que plus un

individu serait éloigné d'une mère, moins il lui serait apparenté. On peut imaginer que plus un allèle compatible serait éloigné d'une mère, plus faible serait la probabilité que le croisement en résultant soit susceptible d'exprimer de la dépression de consanguinité entre la fécondation et le moment où nous avons récolté les merises. Indépendamment de ces résultats, Des modèles théoriques montrent que la reproduction asexuée et le GSI peuvent favoriser l'apparition et le maintien d'allèles délétères, créant un fardeau génétique susceptible de s'exprimer lors des croisements entre individus apparentés (voir Muirhead & Lande 1997 ; Glémin *et al.* 2001). Pour tester cette interprétation, nous avons pour perspective de réaliser des auto-corrélations spatiales des coefficients d'apparentement disponibles dans le logiciel Spagedi (par exemple le F_{ij} de Loiselle *et al.* 1995 ou l'estimateur de Hardy & Vekemans 1999) afin de caractériser la répartition spatiale de la parenté au sein de la population de St-Gobain. Par ailleurs, ces estimateurs de l'apparentement entre individus nous permettront d'identifier son effet spécifique sur la fructification en les intégrant le modèle de fructification.

Globalement, seule l'agrégation spatiale des individus apparentés pourrait avoir un effet délétère sur la fructification. Ainsi, la propagation asexuée diminuerait la proportion de fleurs transformée en fruits probablement à cause d'un effet de *pollen limitation* lié à la structure spatiale inhérente au fait de drageonner et au coût de la géitonogamie appliqué par le GSI.

B). Effet des stratégies de reproduction sur la fructification

1). Apport du GSI dans l'analyse de parenté

De par sa diversité allélique et son fonctionnement, le locus du GSI apporte une quantité non négligeable d'informations qui, prises en compte, modifient les conclusions de paternité pour 203 descendants sur 941 (21.6%). L'augmentation du pouvoir d'exclusion lié à l'ajout de ce marqueur permet premièrement de mettre en évidence un flux de gène externe à la population (erreur de type Ib : on attribue un père de l'échantillon à un descendant alors que son père réel se trouve à l'extérieur de celle-ci), deuxièmement, de diminuer les erreurs de type II (non attribution d'un père à un descendant à la confiance statistique choisie alors que le père est dans l'échantillon) en attribuant un père unique à 40 descendants et enfin troisièmement, de modifier l'attribution statistique d'un père à un descendants (erreur sous-jacente de type Ia : attribution statistique d'un père à un descendant alors que son vrai père est parmi la population voir Oddou-Muratorio *et al.* 2003). Cette diminution apparente des erreurs de type

II et Ia peut néanmoins s'accompagner de la hausse des erreurs de type Ib. Seul le calcul d'un pouvoir d'exclusion qui tiendrait compte de l'information fournie par le locus du GSI nous permettrait de quantifier rigoureusement l'apport de ce locus dans l'analyse de paternité telle que nous l'avons réalisée.

Par ailleurs, la méthode utilisée pour prendre en compte le locus du GSI dans les assignations de paternité n'est pas rigoureuse puisque qu'elle n'intègre pas la puissance de ce marqueur dans le critère de décision statistique. De fait, dans un certain nombre de cas où plusieurs génotypes ont été identifiés comme pères potentiels (multi-paternité), le marqueur du GSI rejette le père identifié comme le plus probable à 95% uniquement à l'aide des microsatellites et désigne comme unique père possible un des pères rejetés par le critère statistique. La méthode utilisée n'est donc pas « propre » statistiquement. Au vu de ces résultats, nous avons donc développé un modèle intégrant l'information de ce locus au critère statistique de décision Δ . Le LOD-score assigné à chaque père prend alors en compte la probabilité mendélienne que celui-ci soit le père d'après l'information des marqueurs codominants multipliés par la probabilité de compatibilité père-mère écrit sous la forme d'un modèle de croisement.

$$L_O(F_j) = P(O_{si} / M_{si}, F_{si}) * \prod_k \frac{P(O_k / M_k, F_k)}{\sum_k P(O_k / M_k, F_k)}$$

où la vraisemblance qu'un arbre F_j soit le père du descendant O tient compte de la probabilité de la formation du descendant O $P(O_{si} / M_{si}, F_{si})$ connaissant les types sexuels de la mère M et du père potentiel F_j et de la probabilité mendélienne que l'arbre F_j soit le père de O pour chaque locus K connaissant le génotype de F_j et de M. Un LOD-Score (logarithme népérien de la vraisemblance) est ainsi assigné à chaque père. Ensuite, par simulation, des seuils statistiques sont identifiés de façon à définir la plus petite différence de LOD-score nécessaire pour désigner un père comme étant le plus probable à une confiance de α %. L'algorithme de ce modèle a été programmé sous la forme d'un logiciel à interface graphique. Il reprend la méthode d'assignation de paternité par maximum de vraisemblance en utilisant le critère statistique Δ correspondant à la différence de LOD-score entre le père le plus probable (donc de plus fort LOD-score positif) et le deuxième père le plus probable de LOD-score positif tout en intégrant au besoin les probabilités de croisements entre individus.

Les premiers résultats montrent que le modèle donne des résultats identiques à Cervus v2.0 lorsque aucun locus d'auto-incompatibilité n'est pris en compte. Cependant, nous devons

encore écrire la quantification de l'apport d'un tel locus sur les pouvoirs d'exclusion. Par ailleurs, un série de test sera être menée afin de vérifier la validité du modèle. Enfin, des discussions en cours pourraient aboutir à l'amélioration du modèle et maximiser l'utilisation de l'information apportée par ce locus fortement discriminant.

2). Dispersion du pollen et polyandrie

Le nombre de pères efficaces par mère est presque deux fois plus petit que le nombre de pères observés par mère. En moyenne, les mères étudiées se croisent donc préférentiellement avec certains mâles. Cependant, la variance des situations est forte. Certaines mères semblent se croiser préférentiellement avec un faible nombre de pères (exemple : l'arbre 363p) alors que d'autres semblent se croiser de façon presque équitable avec les individus qui les pollinisent (exemple : l'arbre 384p). Si la majorité du pollen efficace se disperse à moins de quelques centaines de mètres des arbres, les évènements de pollinisation efficace à plus longue distance restent tout de même non négligeables. La population de St-Gobain (22ha) se situe dans une vallée, en bordure Nord-Est d'un massif forestier étendu (6000ha, Figure 3). Cette situation particulière pourrait avoir une influence négative sur la reproduction sexuée et les flux pollinique en particulier sur la présence et les comportements de fourragements du cortège des pollinisateurs.

Le nombre moyen de pères efficaces par mère est proche de ceux trouvés chez d'autres arbres entomophiles disséminés, *Ficus sp.* (de 2,8 à 10,5 Greeff *et al.* 2001) et *Sorbus torminalis* (4,6 et 6,1 Oddou-Muratorio 2002). Ces arbres présentent une différenciation génétique marquée au regard du critère de Wright ($F_{ST} > 0,05$), ont un nombre de pères efficaces modéré voire petit et des pourcentages de pollution pollinique provenant de l'extérieur des parcelles étudiées plutôt modéré (Smouse & Sork 2004). Malgré une distribution disséminée, ces espèces allogames et entomophiles présentent des évènements de pollinisation à longue distance (Ward *et al.* 2005). Le merisier présente donc un niveau de structuration génétique entre populations moyen, mais plus élevé que ceux observés chez d'autres espèces forestières allogames comme le chêne, le pin maritime ou le frêne.

3). Effets de la propagation asexuée et du GSI sur la paternité

Une autre année de reproduction sexuée est en cours d'analyse et servira de réplique aux analyses de paternité menées sur la génération de graines produites en 2002.

D'après nos résultats sur une année de reproduction et en considérant les fréquences alléliques du GSI sur l'ensemble de la population, nous ne mettons pas en évidence d'effet visible de la

sélection fréquence-dépendante négative. Outre le nombre restreint de descendants analysés par rapport à la production annuelle de graines de la population, il se pourrait que l'échelle à laquelle nous avons regardé les fréquences alléliques des allèles du GSI soit différente de l'échelle à laquelle s'applique la sélection fréquence-dépendante négative.

Du fait de la structuration spatiale de l'apparement, les allèles S rares pourraient avoir un succès de paternité meilleur à courte distance comparé aux arbres porteurs d'allèles S fréquents. A plus longue distance, l'apparement diminuant et le nombre d'individu compatible augmentant, la limitation du nombre de partenaires compatibles due à la sélection fréquence dépendante serait par contre atténuée. L'une des influence majeur qui ressort de nos résultats est l'effet de la distance. Nous avons pour perspective d'utiliser un modèle statistique non linéaire pour analyser conjointement la dispersion pollinique et l'hétérogénéité de la fécondité de groupes d'individus possédant des caractéristiques phénotypiques ou environnementales communes (modèle publié dans Oddou-Muratorio *et al.* 2005).

Par ailleurs, le fait que ce soient les allèles S les plus fréquents qui laissent proportionnellement plus de descendants à la génération suivante semble indiquer que la sélection fréquence-dépendante négative n'est pas suffisamment contraignante dans la population de St-Gobain pour constituer un facteur limitant qui dirigerait la transmission de la diversité allélique parentale à la génération suivante. Globalement, le nombre de croisements compatibles accessibles aux individus étudiés est suffisamment grand pour ne pas conférer un avantage aux individus porteur d'allèles S rares.

Par contre, plus un génotype a de représentants (ramets) dans la population, plus il pollinise de descendants par mère. Ce résultat met en évidence que le système de croisement et la structure spatiale des merisiers en forêt de St-Gobain favorise le succès de reproduction de la composante mâle des génotypes produisant le plus de pollen.

De même, lorsque la distance entre un merisier A et un merisier B diminue, le pollen du merisier A a moins de chance d'être dilué dans du pollen récolté sur des merisiers tierces que le vecteur aurait visité sur le trajet entre A et B. Ainsi, la charge de pollen déposée par un vecteur sur le style d'une mère contiendrait d'autant plus de pollen d'un mâle donné que celui-ci en serait proche. Ce résultat confirmerait que les insectes en conditions forestières visiteraient les merisiers de façon séquentielle en quittant préférentiellement un merisier pour ses plus proches voisins (Osborne & Williams 2001).

Enfin, le fait que les individus de plus gros diamètres fécondent plus de descendants par mère peut s'expliquer par deux interprétations convergentes. D'une part, les individus de gros diamètre pourraient produire une plus grande quantité de gamètes mâles que les individus de

moindre diamètre, soit parce qu'ils comporteraient plus de fleurs dans leur houppier, soit parce qu'ils auraient la possibilité d'allouer plus de ressources dans la production de ces gamètes par fleurs. D'autre part, ces individus auraient une meilleure visibilité ou une meilleure attraction pour les vecteurs que leurs congénères moins gros. Ils seraient donc visités par plus de pollinisateurs qui par conséquent exporteraient en plus grande quantité leur pollen.

Nos résultats vont à l'encontre des prédictions réalisés par Klinkhamer & De Jong (1997). En effet, ils prédisent que chez les plantes plus un génotype est petits, plus la composante mâle de son succès reproducteur devrait être avantagée. Chez les merisiers, nous observons la tendance inverse : comme la géitonogamie (*pollen discounting*) ne semble ne pas être un effet limitant la reproduction sexuée, un génotype qui augmente sa production de fleurs et/ou qui améliore sa visibilité/attraction des vecteurs augmente sa participation à la création de la génération suivante.

V). LE SUCCES ? IL EST FONCTION DES MODES

Pour conclure, les participations individuelles des merisiers à la création des générations suivantes sont inégales. Les systèmes de reproduction alliés à une répartition spatiale qui apparaît fortement structurée semblent favoriser l'occurrence de croisements préférentiels réalisés le plus souvent entre individus spatialement proches. Cependant, une partie plus faible mais non négligeable des descendants est issue de croisements à plus longue distance. La prochaine étape du travail consisterait à évaluer s'il existe un avantage de germination ou de survie favorisant les descendants issus de croisements à plus longues distances et donc *a priori* réalisés entre géniteurs moins apparentés. Ce travail permettrait d'estimer l'éventuelle présence d'un fardeau génétique, théoriquement doublement favorisé par le GSI et la reproduction asexuée (Muirhead & Lande 1997 ; Glémin *et al.* 2001). Nous avons pour perspective d'apporter un premier élément de réponse en réalisant une analyse de parenté (recherche conjointe du couple père-mère) sur les 175 juvéniles déjà prélevés (voir Chapitre I) qui permettrait d'estimer plus finement comment la diversité génétique du merisier se transmet d'une génération à l'autre.

La participation des arbres à la création de la génération suivante ne semble pas être influencée par la disponibilité des allèles S compatibles. En effet, à l'échelle de la population, ceux-ci semblent suffisamment nombreux à St-Gobain pour ne pas constituer un facteur

limitant régissant la création de la génération suivante. A l'inverse, la propagation asexuée semble influencer sur les capacités individuelles des génotypes à participer à la création de la génération suivante. Même si le nombre de ramets par genet n'influe pas sur la composante femelle du succès de reproduction des génotypes, par contre, il favorise la capacité d'un génotype à féconder d'autres arbres. Par conséquent, la reproduction asexuée favorise la participation des génotypes à la création de la génération suivante en tant que mâle. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un effet de *pollen limitation* lorsque un génotype augmente le nombre de ramets du même genet dans son voisinage. Cette diminution du succès reproducteur est probablement imputable à l'augmentation de la dilution du pollen allogame par le pollen géitonogame lorsque la densité locale de fleurs d'un même génotype augmente. L'agrégation des ramets d'un même genet a donc un effet négatif sur la composante femelle du succès de reproduction des merisiers.

Pourtant, l'agrégation des génotypes dans l'espace favorise la capacité des merisiers à produire des descendants en tant que mâle et femelle. De plus, la plupart des croisements se font entre individus spatialement proches. Cette caractéristique est probablement imputable à la quantité et aux comportements de fourragement des espèces pollinisantes présentes en forêt de St-Gobain. Cependant, la « queue lourde » de la courbe de dispersion du pollen et la quantité modérée mais non négligeable de pollen provenant de plus de 771m montrent que les vecteurs permettent l'occurrence de croisements à longue distance. Le fait que les arbres les plus agrégés ou de plus grands diamètres aient une meilleure capacité à produire des descendants souligne l'importance pour les individus de cette espèce entomophile d'être visible et attractif pour ses vecteurs. Par ailleurs, la population de merisiers de St-Gobain produit un grand nombre de fleurs qui ne donnent finalement que peu de fruits. La faiblesse des taux de fructification et le fait que nos résultats témoignent de l'existence d'une compétition inter-individuelle pour détourner les trajectoires des pollinisateurs argumentent en faveur d'un manque de pollinisateur. Au vu de l'occurrence non négligeable de pollinisations à « longue » distance (queue de dispersion pollinique de type lourde), il semblerait que les espèces fourrageant sur des distances égales ou supérieures à celles séparant les merisiers étudiés soient présentes en forêt de St-Gobain. Cependant, ce cortège de pollinisateurs n'est peut être pas quantitativement suffisamment abondant. Un relevé des espèces d'insectes pollinisateurs présentes au moment de la floraison des merisiers permettrait d'une part de déterminer les espèces participant aux cortèges de vecteurs et d'autre part de quantifier leur abondance afin de discuter de la nécessité d'actions favorisant leur développement. Dans cette optique, nous avons effectué des relevés hebdomadaires à l'aide

Table 9: Etude préliminaire de l'abondance et la présence de pollinisateurs dans les merisiers. Relevés de pièges à insectes en forêt et en plaine durant leur période de floraison printemps 2003.

a). En forêt de St-Gobain. 1 : piège dans un merisier de pleine forêt. 2 : piège dans un merisier de lisière.

| | N° du piège | Hyménoptères | Diptères | Coléoptères | Coléoptères (- de 1 mm) | Autres |
|----------|-------------|--------------|------------|-------------|----------------------------|--------|
| 08/04/03 | 1 | 2 | 30 | - | 11 | - |
| | 2 | 8 | 44 | - | 6 | - |
| 16/04/03 | 1 | 2 | nombreuses | 12 | 116 | 4 |
| | 2 | 6 | 22 | 14 | 45 | 2 |
| 23/04/03 | 1 | 4 | 21 | 78 | 80 | 8 |
| | 2 | 10 | 46 | 27 | 63 | 8 |
| 30/04/03 | 1 | 7 | 62 | 571 | 149 | 6 |
| | 2 | 8 | 85 | 62 | 27 | 9 |

b). En plaine dans un verger de merisiers, Nogent-sur-Vernisson (45), domaine des Barres. Chaque piège (de 1 à 8) était posé dans un merisier différent.

| | N° du piège | Hyménoptères | Diptères | Coléoptères | Coléoptères (- de 1 mm) | Autres |
|----------|-------------|--------------|----------|-------------|----------------------------|--------|
| 03/04/03 | 1 | 20 | 19 | - | 39 | 1 |
| | 3 | 24 | 22 | - | 73 | 9 |
| | 4 | 17 | 13 | - | 43 | 3 |
| | 5 | 22 | 8 | - | 67 | 14 |
| | 6 | 22 | 8 | - | 29 | 9 |
| | 7 | 19 | 10 | - | 74 | 5 |
| | 8 | 6 | 7 | - | 22 | 4 |
| | 12/04/03 | 1 | 13 | 58 | - | 3 |
| 2 | | 42 | 34 | - | 6 | 2 |
| 3 | | 30 | 89 | 1 | 7 | 11 |
| 4 | | 49 | 24 | - | 9 | 1 |
| 5 | | 55 | 39 | - | 4 | 3 |
| 6 | | 34 | 38 | - | 3 | 5 |
| 8 | | 14 | 47 | - | 7 | - |

de seau-pièges contenant une solution détergente et conservante perchés dans 2 merisiers, l'un en lisière de bois l'autre au cœur de la forêt. Par soucis de comparaison, nous avons placé les mêmes seau-pièges la même année dans un verger de merisiers situé en clairière. Les premiers résultats montrent une présence bien moindre des Hyménoptères en forêt (Table 9). Or ces insectes sont considérés pour être les principaux pollinisateurs des *Prunus* assurant à la fois la dispersion du pollen sur de longues distances (espèces sociales de type abeilles domestiques ou bourdons) mais aussi un flux de pollen massifs à plus courtes distances grâce principalement aux espèces solitaires (Pesson & Louveaux 1984 ; Jordano 1993). La nécessité d'une meilleure compréhension des facteurs influençant la présence, le maintien et la mobilité des vecteurs ainsi que leurs interactions avec les espèces végétales entomophiles forestières montre que la conservation efficace d'une espèce passe par une compréhension intégrative de son fonctionnement.

Nos résultats permettent de mieux appréhender le fonctionnement présent de cette espèce. L'analyse des modalités de la transmission de sa diversité génétique d'une génération à l'autre permet d'imaginer son évolution à court et moyen terme. Cependant, la conservation efficace des ressources génétiques de cette espèce et une meilleure estimation de son évolution dans les temps à venir nécessiteraient non seulement d'accumuler le même type de données (état de la diversité génétique, fonctionnement et variabilité du système de reproduction et transmission d'une génération à l'autre) sur un plus grand nombre de populations mais aussi d'acquérir des données sur sa diversité génétique sélectionnée et sur ses interactions avec son environnement et les principales espèces composant son écosystème.

Chapitre III



Les générations futures aiment les arbres. Protégeons-les. :o)

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE. INTERET DE NOS RESULTATS DANS LE CADRE DE LA CONSERVATION ET DE LA GESTION DES RESSOURCES GENETIQUES DE *PRUNUS AVIUM* L.

Les résultats présentés et discutés dans les deux premiers chapitres et dans les annexes nous ont permis de tester certaines hypothèses évolutives concernant les systèmes de reproduction à GSI et/ou à reproduction asexuée. Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit avaient initialement pour but de guider les travaux de la Commission Technique des Ressources Génétiques Forestières dans la mise en place d'un réseau de conservation des ressources génétiques de *Prunus avium* L. Nous nous attachons donc dans cette dernière partie à montrer en quoi notre étude peut servir à donner des recommandations pratiques en terme de mise en place du réseau de conservation et de la gestion courante des ressources génétiques de l'espèce.

I). DIVERSITE ET STRUCTURATION INTER-POPULATIONS CHEZ UNE ESPECE A SI ET DRAGEONNAGE

Du point de vue fondamental, connaître quels sont les effets des différents systèmes de reproduction sur les valeurs de différenciation intra- et inter-populationnelle permet de mieux comprendre comment fonctionnent et évoluent les populations d'espèces à systèmes de reproduction mixtes (Butlin 2003 ; Richards 2003). En particulier, Hamrick *et al.* (1992) et Hamrick et Godt (1996) ont montré que les populations d'arbres forestiers présentent de hauts niveaux de diversité intra-population et de faibles niveaux de structuration inter-populations. Ils expliquent ces observations expérimentales par le fait que les espèces forestières ont pour la grande majorité des aires de répartition continues, des systèmes de reproduction allogames stricts et des graines largement dispersées. Au cours d'une très récente étude comparative de la structure génétique chez les plantes, Duminil (2006) a montré que, parmi les différents paramètres regardés par Hamrick, seul le système de reproduction demeure significatif lorsque l'on tient compte des relations phylogénétiques entre espèces et lorsque l'on tient compte des corrélations entre caractéristiques biologiques. Globalement, les espèces qui pratiquent l'allogamie ont une tendance à afficher des niveaux de différenciation génétiques moindres que des espèces présentant des taux d'allogamies plus faibles (Slatkin, 1985 ; Ferrer

et al. 2004). Notre chapitre 1, qui s'est focalisé sur l'impact du système de reproduction de l'espèce sur les caractéristiques de structuration génétique de l'espèce, nous semble donc pertinent au regard des récentes conclusions de Duminil (2006).

A une échelle intra-populationnelle, nos résultats montrent que lorsque l'on tient compte des répétitions de génotypes dues au drageonnage, les populations de merisiers présentent des excès d'hétérozygotes. Par ailleurs, le GSI semble entraîner les croisements alléliques de loci neutres physiquement situés dans sa proximité et créer des excès d'hétérozygotes. En petite population, le fonctionnement du GSI influencerait la totalité du génome de l'espèce, entraînant l'observation de F_{IS} négatifs à des loci neutres non liés au GSI (Glémin *et al.*, 2001 ; Balloux 2004). Globalement, le système de reproduction de *Prunus avium* L. tend à favoriser le maintien, voire l'excès, d'hétérozygotes dans les populations.

A l'échelle des populations, ces deux systèmes de reproduction ont des effets divergents : la propagation asexuée sous forme de drageonnage tend à accroître la différenciation inter-populations. Les drageons de populations différentes portent préférentiellement des allèles différents soit par hasard soit par un effet d'entraînement d'une sélection endémique sur un ou des loci proches. De fait, les fréquences alléliques entre populations divergent et l'espèce devient plus différenciée entre populations qu'au sein d'une même population.

A l'inverse, le GSI présente une structuration génétique faible entre populations témoignant de l'existence d'une migration efficace plus élevée que celle estimée aux loci neutres non liés. Cette faible différenciation peut être attribuée au mode de croisements imposé aux allèles de ce locus sous sélection balancée. Ainsi, le GSI favoriserait la migration des génotypes des migrants et leur maintien dans les populations d'accueil en limitant les effets de dérive. Cependant, seul un locus neutre physiquement lié semble entraîné par son mode de fonctionnement. A 1cM, ce microsatellite présente une structuration très faible, proche de celle observée au locus du GSI.

Du point de vue appliqué, connaître les niveaux de structuration est indispensable pour la mise en place des réseaux de conservation. Les valeurs de différenciation entre populations doivent orienter les choix stratégiques de la mise en place des réseaux de conservation puisqu'elles détermineront quantitativement et qualitativement la variabilité échantillonnée par le réseau et de son maintien au cours des générations (voir Annexe 4). Dans le cas de populations fortement différenciées, le choix des populations à intégrer au réseau nécessitera une connaissance approfondie des valeurs et de la structuration de cette différenciation sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce. Par ailleurs, il est fort probable que ce réseau

de conservation doit prendre en compte un plus grand nombre de populations. A l'inverse, dans le cas d'une espèce faiblement différenciée entre populations, on peut penser qu'un échantillonnage aléatoire de peu de populations pourrait suffire à englober efficacement une grande partie de la variabilité génétique de l'espèce. Cependant, d'après Moritz (1999 ; 2002), la conservation d'une espèce se doit avant tout de protéger des processus écologiques et génétiques plutôt que des spécificités phénotypiques ou génétiques qui sont eux-mêmes des produits de ces processus. La conservation devrait donc s'attacher à protéger des populations évoluant indépendamment les unes des autres depuis des temps significatifs (concept d'Evolutionarily Significant Units, ESU).

D'après nos résultats, les populations de merisiers présentent un niveau de structuration moyen (Annexe 4). Leur différenciation inter-dèmes est plus élevée que ce qui a été observé chez la plupart des espèces forestières allogames, comme le chêne ou le pin maritime. Or au niveau français, nous ne disposons de données que sur 6 populations (voir Annexe 4), ce qui, compte tenu de la différenciation des populations, ne permet pas de couvrir la répartition française du merisier. La prise en compte de la diversité génétique à l'échelle de la France nécessite que nos connaissances tiennent compte des contraintes environnementales (géographiques, biotiques ou abiotiques) susceptibles d'influer sur les valeurs de structuration. De fait, définir le nombre et l'identité des populations qui devraient rejoindre un réseau de conservation nécessiterait que des études supplémentaires s'attachent à caractériser la valeur et la variance de cette structuration ainsi que sa répartition géographique.

L'utilisation d'autres méthodes d'analyses comme Structure, Partition ou Baps (Pritchard et al. 2000 ; Dawson & Belkhir 2001 ; Corander *et al.* 2003) permettrait d'identifier le nombre de clusters différenciés pouvant servir de base à un réseau de conservation. Parmi ces méthodes, celle de Dupanloup *et al.* (2002) semble particulièrement indiquée pour la conservation des ressources génétiques car elle prend en compte les situations spatiales des populations ce qui permet de localiser les barrières aux flux de d'allèles entre des groupes prédéfinis (unité de managements MU) (Pearse & Crandall 2004).

Enfin, la limite de notre étude est que nos travaux se sont focalisés principalement sur l'impact de la propagation asexuée et du GSI sur la diversité génétique neutre de l'espèce, sa structuration et son évolution. Cette diversité génétique neutre ne représente qu'une partie du polymorphisme génétique global d'une espèce. Si certains auteurs montrent que la variabilité phénotypique peut être corrélée à la diversité (Reed & Frankham 2001 ; Navarro *et al.* 2005), d'autres études montrent que la variabilité adaptative n'est pas forcément assimilable ou déductible de ce qu'on peut observer au niveau de loci neutres (Merila et Crnokrak 2001 ;

McKay & Latta 2002). Etant donné l'importance de la variabilité phénotypique, principale ressource exploitée par l'Homme chez une espèce, il paraît nécessaire d'envisager d'estimer celle-ci à l'échelle de la France et de connaître sa répartition, comment elle y évolue dans l'espace et le temps.

II). FAIRE LE CLONE : UNE STRATEGIE RISQUEE POUR LE MERISIER ?

L'identification de l'impact de la reproduction asexuée sur la reproduction sexuée est importante d'un point de vue évolutif. D'après le modèle théorique de Peck & Waxman (2000), lorsque une population effectue peu de recombinaisons et se reproduit majoritairement par voie asexuée, un effet évolutif de fuite en avant peut la conduire à perdre complètement la capacité génétique de produire des descendants par voie sexuée en favorisant l'accumulation d'allèles délétères et en rendant les événements de recombinaison infertiles (Richards 2003). Chez certaines espèces, le fait de combiner une propagation asexuée à une reproduction sexuée contrôlée par un système d'auto-incompatibilité semble diminuer l'efficacité de la reproduction sexuée à produire des descendants à un point tel que certaines populations ne semblent plus se reproduire que par voie asexuée (Aspinwall & Chrisitan 1992 ; Dorken & Eckert 2001 ; Wang *et al.* 2005).

Du fait de leur caractère stationnaire, la propagation asexuée de type repousse (*sprouting*) chez les plantes sous-entend une agrégation locale des ramets d'un même genet. Si cette configuration spatiale peut être bénéfique à une espèce disséminée entomophile comme le merisier en augmentant le flux de vecteurs (effet Allee voir Annexe 2), elle peut aussi être synonyme d'une forte augmentation des transferts de pollen géitonogames au sein d'un même genet (Klinkhammer & De Jong 1997). Chez une espèce auto-incompatible, la production et le transport de pollen géitonogame est infertile et vain. Par conséquent, on s'attend à ce que la propagation asexuée favorise les phénomènes de *pollen discounting* et de *pollen limitation* comme cela a été précédemment observé chez des espèces combinant propagation asexuée et système d'auto-incompatibilité (Aspinwall & Chrisitan 1992 ; Dorken & Eckert 2001 ; Wang *et al.* 2005).

Chez les merisiers, nos résultats montrent que le drageonnage ne semble pas handicaper la capacité d'un génotype à produire des fruits par pollinisation. Par contre, la propagation asexuée semble diminuer le taux de fructification des genets drageonnant lorsque ceux-ci comportent peu de génotypes différents dans leur voisinage. Chez cette espèce, nos résultats semblent indiquer que ce ne soit pas la propagation asexuée qui constitue un frein à la

reproduction sexuée mais la répartition des drageons dans l'espace. Par ailleurs, les génotypes qui drageonnent améliorent leur succès reproducteur en tant que mâles. En produisant une plus grande quantité de pollen, ils constituent des sources de pollen efficace au sein d'une population. Par conséquent, tant du point de vue de la composante femelle que de la composante mâle, nos résultats suggèrent que la reproduction asexuée peut être « profitable » aux succès reproducteurs à partir du moment où la répartition spatiale des taches de drageonnage leur permet d'entrer en interaction avec des génotypes différents.

D'après ces constatations et dans l'état actuel de nos connaissances, nous serions tentés de recommander aux gestionnaires de favoriser l'agrégation spatiale des génotypes de merisier en forêt puisque celle-ci augmente la proportion de fleurs transformée en fruits (effet Allee local). Cependant, il est nécessaire d'éviter que quelques génotypes ne se propagent massivement par voie asexuée au sein de ces taches étant donné que cela réduirait l'efficacité du peuplement à produire des graines et pourrait aboutir à plus long terme à l'abandon de la reproduction sexuée (Peck & Waxman 2000). Cependant, il est important de ne pas éliminer la capacité de l'espèce à se propager par voie asexuée. L'effet Allee local créé par une propagation asexuée est probablement nécessaire à l'espèce pour pouvoir coloniser de nouveaux environnements. La propagation asexuée peut être un moyen efficace pour des individus en fondation de peuplement d'attendre l'arrivée d'autres génotypes en se maintenant dans le temps et de pouvoir augmenter leur visibilité vis à vis de leur pollinisateurs afin de les détourner de leurs anciennes trajectoires et ainsi d'assurer l'arrivée de pollen allogame. De plus, dans le cas où ce caractère posséderait un déterminisme génétique, contre sélectionner définitivement ce caractère au risque qu'il disparaisse de la diversité génétique et des possibilités phénotypiques de l'espèce serait contraire au principe de précaution qui est à l'origine même de l'instauration d'un réseau de conservation des ressources génétiques d'une espèce.

III). METTONS NOUS ALLO-GAME ?

Du point de vue fondamental, le fonctionnement du GSI facilite la migration efficace d'allèles S entre populations et limite les effets de dérive à ce locus d'autant plus efficacement que la population est petite. Cette mobilité constitue un avantage certain chez une espèce disséminée et, bien que nos résultats argumentent contre cette hypothèse, le locus du GSI pourrait globalement œuvrer à entraîner la mobilité de l'ensemble des allèles du génome comme semble le penser certains auteurs (Kercher & Conner 1996 ; Ferrer *et al.* 2004 ; Lukas *et al.*

2004). Avec 10 à 19 allèles S par population, il semble que le GSI ne soit pas un facteur limitant la reproduction sexuée de l'espèce. Si cela avait été le cas, nous aurions observé un effet fort de la sélection fréquence-dépendante négative sur les succès reproducteurs individuels. Le faible taux de fructification trouvé chez cette espèce semblerait plutôt imputable à un manque de pollinisateurs. Cependant, l'effet fort de la distance pourrait masquer l'effet plus faible du GSI (*i.e.* pas d'avantage aux allèles rares) sur les succès reproducteurs. Nous avons pour perspective d'utiliser d'autres méthodes comme celle de Oddou *et al.* (2005) pour identifier avec plus de puissance le effet potentiel du GSI d'autres méthodes.

Par ailleurs, le GSI de part son fonctionnement peut favoriser le maintien d'allèles délétères à des loci liés. L'expression de la dépression de consanguinité associée pourrait expliquer les faibles taux de fructifications observés chez certaines espèces et pourrait expliquer le maintien du GSI chez le merisier alors que cette espèce pousse souvent en petites populations moyennement isolées (Glémin *et al.* 2001).

En attendant des études plus approfondies et compte tenu de ces éléments, nous serions tentés de recommander aux gestionnaires de préférentiellement favoriser le maintien du merisier en populations de taille suffisamment importante et d'éviter que des populations soient isolées des autres pour limiter l'occurrence des croisements entre individus consanguins. Une surveillance régulière par génotypage des allèles S des populations devrait permettre de vérifier que les populations retenues dans le réseau de conservation *in situ* maintiennent un nombre suffisant d'allèles S, comme cela semble pour l'instant être le cas dans les 3 populations étudiées, pour que le GSI ne devienne pas un facteur limitant de la reproduction sexuée.

IV). DE L'IMPORTANCE DE CONSERVER L'ESPECE, MAIS AUSSI LES VECTEURS BIOLOGIQUES DE SA REPRODUCTION

Au cours de ce manuscrit, nous avons vu l'importance de considérer le système de reproduction comme facteur prépondérant dans l'explication du niveau de structuration et les flux de gènes intra- et entre populations. Cependant, favoriser la reproduction sexuée chez une espèce entomophile nécessite que l'on s'intéresse à ses pollinisateurs. En tant qu'agents médiateurs des flux de gènes, ils constituent une pression de sélection suffisante pour influencer sur les processus évolutifs des plantes qu'ils pollinisent (Kearns *et al.* 1998). De nombreuses

études rapportent que le nombre et les espèces d'Insectes pollinisateurs tendent à décliner dans les écosystèmes européens, probablement dû aux activités humaines (Goulson *et al.* 2005). Des auteurs plus sceptiques à propos des impacts réels de ce déclin généralisé sur la capacité des plantes cultivées à produire des graines sont pourtant d'accord pour dire que cette diminution de l'abondance des pollinisateurs pourraient avoir un impact significatif chez les espèces poussant dans des écosystèmes fragmentés par les activités humaines (Ghazoul 2005). La destruction d'habitats semi naturels et les modifications de la gestion des écosystèmes modifieraient parfois drastiquement la composition et la quantité d'insectes dans les cortèges des pollinisateurs (Kearns *et al.* 1998). Chez les Prunus, à la suite d'une synthèse d'études qui ont montré que le renforcement local en Hyménoptères augmente significativement la quantité de fleurs pollinisé en fruits, Pesson & Louveaux (1984) proposent aux arboriculteurs de Prunus de renforcer leurs vergers en bourdons ou en abeilles. La conservation des ressources génétiques des populations forestières de merisier pourrait nécessiter la mise en place d'études intégratives prenant en compte les relations interspécifiques, la démographie et la diversité génétique des espèces vivant dans l'écosystème des merisiers. D'autre études arrivent actuellement au même constat : malgré les avancées de nos connaissances sur le fonctionnement génétique des populations chez de nombreuses espèces lorsqu'elles sont prises une à une, nous avons peu d'idées sur les rôles que peuvent jouer les interactions croisées entre les diversités génétique spécifiques des espèces d'une même communauté écologique sur les processus évolutifs (Neuhauser *et al.* 2003 ; Bangert *et al.* 2005 ; Johnson *et al.* 2006). Une nouvelle discipline en train d'émerger pourrait apporter des réponses à ces questions (Antonovics 1992) et permettre d'envisager la conservation des ressources génétiques du merisier de façon plus efficace en incluant la protection des espèces nécessaire à son maintien en population.

Si l'assemblage des espèces en communautés écologiques provient d'un ensemble d'interactions entre organismes, il est aussi contraint par l'environnement abiotique (Walther *et al.* 2002). Une modification des conditions abiotiques pourrait perturber les liens entre organismes d'une même communauté. Or les efforts de recherche des vingt dernières années ont montré une tendance globale et locale du climat à se réchauffer probablement à cause de l'augmentation atmosphérique de la concentration des gaz à effets de serre (Hughes 2000). Deux des principaux effets attendus peuvent avoir des effets néfastes sur la pérennité et l'efficacité d'un réseau de conservation des ressources génétiques d'une espèce ligneuse longévive entomophile et zoochore. Des études empiriques et théoriques ont montré que les espèces ont tendance depuis un siècle à déplacer leurs aires de répartition vers le nord

(Kullman 2001). Par ailleurs, on s'attend à ce qu'un réchauffement climatique rapide à l'échelle géologique et des processus évolutifs influent de façon variable sur la phénologie des espèces (Fitter & Fitter 2002). De fait, le réchauffement climatique pourrait aboutir au découplage des synchronisations phénologiques interspécifiques et à un changement des structures et de la composition des communautés d'espèces (Hughes 2000). Concernant le merisier, l'un des enjeux pour les biologistes et les gestionnaires dans les prochaines années pourrait consister à réussir à maintenir les relations mutualistes entre cette espèce entomophile et zoochore et les animaux participant à sa pollinisation et à la dispersion de ses graines.

La conservation des ressources génétiques des merisiers nécessitera donc probablement de prendre en compte d'autres facteurs que ceux uniquement liés à l'espèce. Le réseau devra assurer qu'un nombre suffisant de pollinisateurs et d'espèces pollinisatrices soient présents dans l'écosystème du merisier et que les liens mutualistes et synchrones entre la plante et ses vecteurs soient maintenus de façon efficace dans l'espace et le temps. Cependant, considérer la conservation du merisier d'un point vu plus intégratif nécessitera l'acquisition de connaissances et la mise en place de programme de recherche permettant de situer le merisier dans le contexte des communautés écologiques et génétiques et de prendre en compte des modifications potentielles des conditions abiotiques permettant à ces communautés de se maintenir.

BIBLIOGRAPHIE

- Agrawal AF (2001) Sexual selection and the maintenance of sexual reproduction. *Nature* **411**, 692-695.
- Allee WC, Emerson AE, Park O, Park T, Schmidt KP (1949) *Principals of animal ecology*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Antonovics J (1992) Towards community genetics. In: *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens: Ecology, Evolution and Genetics* (eds. Fritz RS, Simms EL). University of Chicago Press, Chicago.
- Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P, *et al.* (2003) A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the Prunus genome. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 819-825.
- Aspinwall N, Christian T (1992) Clonal Structure, Genotypic Diversity, and Seed Production in Populations of *Filipendula-Rubra* (Rosaceae) from the Northcentral United-States. *American Journal of Botany* **79**, 294-299.
- Balloux F (2004) Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution* **58**, 1891-1900.
- Balloux F, Lehmann L, de Meeus T (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* **164**, 1635-1644.
- Bangert RK, Turek RJ, Martinsen GD, *et al.* (2005) Benefits of conservation of plant genetic diversity to arthropod diversity. *Conservation Biology* **19**, 379-390.
- Barrett SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* **3**, 274-284.
- Barrett SCH (2003) Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **358**, 991-1004.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., N. R, F B (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire GPI, CNRS UMR 5000, Univ. de Montpellier II, , Montpellier (France).
- Bell JM, Karron JD, Mitchell RJ (2005) Interspecific competition for pollination lowers seed production and outcrossing in *Mimulus ringens*. *Ecology* **86**, 762-771.
- Bengtsson BO (2003) Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. *Journal of Evolutionary Biology* **16**, 189-199.

- Bengtsson BO, Ceplitis A (2000) The balance between sexual and asexual reproduction in plants living in variable environments. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 415-422.
- Bilger I (1999) Merisier. In: *Conserver les ressources génétiques forestière en France*. (ed. Tessier du Cros E). Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Bureau des Ressources Génétiques, CRGF., Paris.
- Birky CW (1996) Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics* **144**, 427-437.
- Bond WJ, Midgley JJ (2001) Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 45-51.
- Boskovic R, Tobutt KR (2001) Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 475-485.
- Brys R, Jacquemyn H, Endels P, *et al.* (2004) Reduced reproductive success in small populations of the self-incompatible *Primula vulgaris*. *Journal of Ecology* **92**, 5-14.
- Burt A (2000) Perspective: Sex, recombination, and the efficacy of selection - Was Weismann right? *Evolution* **54**, 337-351.
- Bush RM, Smouse PE (1991) The Impact of Electrophoretic Genotype on Life-History Traits in *Pinus-Taeda*. *Evolution* **45**, 481-498.
- Butlin R (2002) The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nature Reviews Genetics* **3**, 311-317.
- Byers DL, Meagher TR (1992) Mate Availability in Small Populations of Plant-Species with Homomorphic Sporophytic Self-Incompatibility. *Heredity* **68**, 353-359.
- Campbell JM, Lawrence MJ (1981a) The Population-Genetics of the Self-Incompatibility Polymorphism in *Papaver-Rhoeas* .1. the Number and Distribution of S-Alleles in Families from 3 Localities. *Heredity* **46**, 69-79.
- Campbell JM, Lawrence MJ (1981b) The Population-Genetics of the Self-Incompatibility Polymorphism in *Papaver-Rhoeas* .2. the Number and Frequency of S-Alleles in a Natural-Population (R106). *Heredity* **46**, 81-90.
- Caruso CM (1999) Pollination of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): Effects of intra- vs. interspecific competition. *American Journal of Botany* **86**, 663-668.
- Castric V, Vekemans X (2004) Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Molecular Ecology* **13**, 2873-2889.

- Charnov EL (1976) Optimal Foraging, Marginal Value Theorem. *Theoretical Population Biology* **9**, 129-136.
- Charpentier A (2001) Consequences of clonal growth for plant mating. *Evolutionary Ecology* **15**, 521-530.
- Chesser RK (1991) Gene Diversity and Female Philopatry. *Genetics* **127**, 437-447.
- Company RSI, Aparisi JG, Alonso JM (2005) Year and enclosure effects on fruit set in an autogamous almond. *Scientia Horticulturae* **104**, 369-377.
- Corander J, Waldmann P, Sillanpaa MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* **163**, 367-374.
- David P (1998) Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity* **80**, 531-537.
- Dawson KJ, Belkhir K (2001) A Bayesian approach to the identification of panmictic populations and the assignment of individuals. *Genetical Research* **78**, 59-77.
- De Cuyper B, Sonneveld T, Tobutt KR (2005) Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology* **14**, 945-955.
- De Nettancourt D (2001) *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*, 2nd edn. Springer, Berlin.
- Dejong TJ, Waser NM, Klinkhamer PGL (1993) Geitonogamy - the Neglected Side of Selfing. *Trends in Ecology & Evolution* **8**, 321-325.
- Del Tredici P (2001) Sprouting in temperate trees: A morphological and ecological review. *Botanical Review* **67**, 121-140.
- Delmotte F, Leterme N, Gauthier JP, Rispe C, Simon JC (2002) Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**, 711-723.
- DesRochers A, Lieffers VJ (2001) The coarse-root system of mature *Populus tremuloides* in declining stands in Alberta, Canada. *Journal of Vegetation Science* **12**, 355-360.
- Dirlewanger E, Graziano E, Joobeur T, *et al.* (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9891-9896.
- Dorken ME, Eckert CG (2001) Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* **89**, 339-350.
- Ducci F, Santi F (1997) The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*). *Canadian Journal of Forest Research* **27**, 1998-2004.

- Duminil J (2006) *Etudes comparatives de la structure génétique chez les plantes*, Université Henri Poincaré.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* **11**, 2571-2581.
- Eckert CG (2001) The loss of sex in clonal plants. *Evolutionary Ecology* **15**, 501-520.
- Eckert CG, Massonnet B, Thomas JJ (2000) Variation in sexual and clonal reproduction among introduced populations of flowering rush, *Butomus umbellatus* (Butomaceae). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **78**, 437-446.
- Evett IW, Weir BS (1998) *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer, Sunderland.
- Ferrer MM, Eguiarte LE, Montana C (2004) Genetic structure and outcrossing rates in *Flourensia cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the South-western Chihuahuan Desert. *Annals of Botany* **94**, 419-426.
- Fitter AH, Fitter RSR (2002) Rapid changes in flowering time in British plants. *Science* **296**, 1689-1691.
- Franklin-Tong N, Franklin FCH (2003b) Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science* **8**, 598-605.
- Franklin-Tong VE, Franklin FCH (2003a) The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **358**, 1025-1032.
- Frascaria N, Santi F, Gouyon PH (1993) Genetic Differentiation within and among Populations of Chestnut (*Castanea-Sativa* Mill) and Wild Cherry (*Prunus-Avium* L). *Heredity* **70**, 634-641.
- Ghazoul J (2005) Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 367-373.
- Glemin S, Bataillon T, Ronfort J, Mignot A, Olivieri I (2001) Inbreeding depression in small populations of self-incompatible plants. *Genetics* **159**, 1217-1229.
- Glemin S, Gaude T, Guillemin ML, *et al.* (2005) Balancing selection in the wild: Testing population genetics theory of self-incompatibility in the rare species *Brassica insularis*. *Genetics* **171**, 279-289.
- Goodwillie C, Kalisz S, Eckert CG (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: Occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **36**, 47-79.

- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Goulson D, Hanley ME, Darvill B, Ellis JS, Knight ME (2005) Causes of rarity in bumblebees. *Biological Conservation* **122**, 1-8.
- Greff JM, Nason JD, Compton SG (2001) Skewed paternity and sex allocation in hermaphroditic plants and animals. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 2143-2147.
- Guillemaud T, Mieuze L, Simon JC (2003) Spatial and temporal genetic variability in French populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Heredity* **91**, 143-152.
- Haag CR, Hottinger JW, Riek M, Ebert D (2002) Strong inbreeding depression in a *Daphnia* metapopulation. *Evolution* **56**, 518-526.
- Halkett F, Simon JC, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 194-201.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **351**, 1291-1298.
- Hamrick JL, W. GMJ, L. S-BS (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* **6**, 95-124.
- Hansson B, Westerberg L (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology* **11**, 2467-2474.
- Harder LD, Barrett SCH (1995) Mating Cost of Large Floral Displays in Hermaphrodite Plants. *Nature* **373**, 512-515.
- Hardy OJ, Vekemans X (1999) Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* **83**, 145-154.
- Hartl D, Clark A (1997) *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Herrera CM, Jordano P, Guitian J, Traveset A (1998) Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept: Reassessment of principles and relationship to pollination and seed dispersal. *American Naturalist* **152**, 576-594.
- Honnay O, Bossuyt B (2005) Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? *Oikos* **108**, 427-432.
- Hughes L (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already apparent? *Trends in Ecology & Evolution* **15**, 56-61.

- Jacquemyn H, Brys R, Honnay O, Hermy M, Roldan-Ruiz I (2006) Sexual reproduction, clonal diversity and genetic differentiation in patchily distributed populations of the temperate forest herb *Paris quadrifolia* (Trilliaceae). *Oecologia* **147**, 434-444.
- Johnson MTJ, Lajeunesse MJ, Agrawal AA (2006) Additive and interactive effects of plant genotypic diversity on arthropod communities and plant fitness. *Ecology Letters* **9**, 24-34.
- Jordano P (1993) Pollination Biology of *Prunus-Mahaleb* L - Deferred Consequences of Gender Variation for Fecundity and Seed Size. *Biological Journal of the Linnean Society* **50**, 65-84.
- Judson OP, Normark BB (1996) Ancient asexual scandals. *Trends in Ecology & Evolution* **11**, A41-A46.
- Kato S, Mukai Y (2004) Allelic diversity of S-RNase at the self-incompatibility locus in natural flowering cherry populations (*Prunus lannesiana* var. *speciosa*). *Heredity* **92**, 249-256.
- Kearns CA, Inouye DW, Waser NM (1998) Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 83-112.
- Kercher S, Conner JK (1996) Patterns of genetic variability within and among populations of wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **83**, 1416-1421.
- Kery M, Matthies D, Schmid B (2003) Demographic stochasticity in population fragments of the declining distylous perennial *Primula veris* (Primulaceae). *Basic and Applied Ecology* **4**, 197-206.
- Klinkhamer PGLdJ, T. J. 1997 Size-dependent allocation to male and female reproduction. In *Plant resource allocation* (ed. F. A. Bazzaz & J. Grace), pp. 211-229. San Diego: Academic Press. (1997) Size-dependent allocation to male and female reproduction. In: *Plant resource allocation* (eds. Bazzaz FA, Grace J), pp. 211-229. Academic Press, San Diego.
- Kokko H, Rankin DJ (2006) Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **361**, 319-334.
- Kondrashov AS (1993) Classification of Hypotheses on the Advantage of Amphimixis. *Journal of Heredity* **84**, 372-387.
- Kullman L (2001) 20th century climate warming and tree-limit rise in the southern Scandes of Sweden. *Ambio* **30**, 72-80.

- Lamont BB, Wiens D (2003) Are seed set and speciation rates always low among species that resprout after fire, and why? *Evolutionary Ecology* **17**, 277-292.
- Lawrence MJ (2000) Population genetics of the homomorphic self-incompatibility polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* **85**, 221-226.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial Genetic-Structure of a Tropical Understory Shrub, *Psychotria Officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **82**, 1420-1425.
- Lukas D, Bradley BJ, Nsubuga AM, *et al.* (2004) Major histocompatibility complex and microsatellite variation in two populations of wild gorillas. *Molecular Ecology* **13**, 3389-3402.
- Mantel N (1974) Approaches to a health research occupancy problem. *Biometrics* **30**, 355-362.
- Mariette S, Lefranc M, Legrand P, *et al.* (1997) Genetic variability in wild cherry populations in France. Effects of colonizing processes. *Theoretical and Applied Genetics* **94**, 904-908.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Maynard Smith J (1978) *The Evolution of Sex* Cambridge University Press.
- McKay JK, Latta RG (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 285-291.
- Meagher TR (1986) Analysis of Paternity within a Natural-Population of *Chamaelirium-Luteum* .1. Identification of Most-Likely Male Parents. *American Naturalist* **128**, 199-215.
- Merila J, Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 892-903.
- Montalvo AM, Conard SG, Conkle MT, Hodgskiss PD (1997) Population structure, genetic diversity, and clone formation in *Quercus chrysolepis* (Fagaceae). *American Journal of Botany* **84**, 1553-1564.
- Morales CL, Galetto L (2003) Influence of compatibility system and life form on plant reproductive success. *Plant Biology* **5**, 567-573.
- Moritz C (1999) Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas* **130**, 217-228.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology* **51**, 238-254.

- Muirhead CA, Lande R (1997) Inbreeding depression under joint selfing, outcrossing, and asexuality. *Evolution* **51**, 1409-1415.
- Navarro C, Cavers S, Pappinen A, *et al.* (2005) Contrasting quantitative traits and neutral genetic markers for genetic resource assessment of Mesoamerican *Cedrela odorata*. *Silvae Genetica* **54**, 281-292.
- Neigel JE (2002) Is F-ST obsolete? *Conservation Genetics* **3**, 167-173.
- Neuhauser C, Andow DA, Heimpel GE, *et al.* (2003) Community genetics: Expanding the synthesis of ecology and genetics. *Ecology* **84**, 545-558.
- Nilsson PG, Levinton JS, Kurdziel JP (2000) Migration of a marine oligochaete: induction of dispersal and microhabitat choice. *Marine Ecology-Progress Series* **207**, 89-96.
- Oddou-Muratorio S (2002) *Impact des processus démographiques et spatiaux sur la diversité génétique des arbres forestiers. Le cas d'une espèce disséminée, l'alisier torminal (Sorbus torminalis L. Crantz)*, ENGREF.
- Oddou-Muratorio S, Houot ML, Demesure-Musch B, Austerlitz F (2003) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology* **12**, 3427-3439.
- Oddou-Muratorio S, Klein EK, Austerlitz F (2005) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent-offspring analysis. *Molecular Ecology* **14**, 4441-4452.
- Orive ME (1993) Effective Population-Size in Organisms with Complex Life-Histories. *Theoretical Population Biology* **44**, 316-340.
- Osborne JL, Williams IH (2001) Site constancy of bumble bees in an experimentally patchy habitat. *Agriculture Ecosystems & Environment* **83**, 129-141.
- Paland S, Lynch M (2006) Transitions to asexuality result in excess amino acid substitutions. *Science* **311**, 990-992.
- Parciak W (2002) Environmental variation in seed number, size, and dispersal of a fleshy-fruited plant. *Ecology* **83**, 780-793.
- Pearse DE, Crandall KA (2004) Beyond F-ST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics* **5**, 585-602.
- Peck JR, Waxman D (2000) What's wrong with a little sex? *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 63-69.
- Pesson P, Louveaux J (1984) *Pollinisation et productions végétales* INRA Paris.

- Porcher E, Lande R (2005) The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 497-508.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Prugnolle F, Roze D, Theron A, De Meeus T (2005) F-statistics under alternation of sexual and asexual reproduction: a model and data from schistosomes (platyhelminth parasites). *Molecular Ecology* **14**, 1355-1365.
- Reed DH, Frankham R (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* **55**, 1095-1103.
- Reinartz JA, Les DH (1994) Bottleneck-Induced Dissolution of Self-Incompatibility and Breeding System Consequences in *Aster Furcatus* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **81**, 446-455.
- Reusch TBH (2001) Fitness-consequences of geitonogamous selfing in a clonal marine angiosperm (*Zostera marina*). *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 129-138.
- Richards AJ (1996) Breeding systems in flowering plants and the control of variability. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* **31**, 283-293.
- Richards AJ (2003) Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **358**, 1085-1093.
- Rousset F, Ronce O (2004) Inclusive fitness for traits affecting metapopulation demography. *Theoretical Population Biology* **65**, 127-141.
- Routley MB, Kron P, Husband BC (2004) The consequences of clone size for paternal and maternal success in domestic apple (*Malus X Domestica*). *American Journal of Botany* **91**, 1326-1332.
- Schierup MH (1998) The number of self-incompatibility alleles in a finite, subdivided population. *Genetics* **149**, 1153-1162.
- Shibayama Y, Kadono Y (2003) Floral morph composition and pollen limitation in the seed set of *Nymphaea indica* populations. *Ecological Research* **18**, 725-737.
- Siller S (2001) Sexual selection and the maintenance of sex. *Nature* **411**, 689-692.
- Slate J, Kruuk LEB, Marshall TC, Pemberton JM, Clutton-Brock TH (2000) Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **267**, 1657-1662.

- Slatkin M (1985) Gene Flow in Natural-Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 393-430.
- Smouse PE, Sork VL (2004) Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management* **197**, 21-38.
- Sonneveld T, Robbins T, Tobutt K (*in press*) Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron PCR products. *Plant Breeding*.
- Sonneveld T, Robbins TP, Boskovic R, Tobutt KR (2001) Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 1046-1055.
- Sonneveld T, Tobutt KR, Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1059-1070.
- Storz JF, Bhat HR, Kunz TH (2001) Genetic consequences of polygyny and social structure in an Indian fruit bat, *Cynopterus sphinx*. I. Inbreeding, outbreeding, and population subdivision. *Evolution* **55**, 1215-1223.
- Tavaud M (2002) *Diversité génétique du erisier doux (Prunus avium L.) sur son aire de répartition. Comparaison avec ses espèces apparentées (P.cerasus et P.x gondouinii) et son compartiment sauvage.*
- Tavaud M, Zanetto A, David JL, Laigret F, Dirlewanger E (2004) Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus x gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity* **93**, 631-638.
- Ushimaru A, Kikuzawa K (1999) Variation of breeding system, floral rewards, and reproductive success in clonal *Calystegia* species (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* **86**, 436-446.
- Vekemans X, Schierup MH, Christiansen FB (1998) Mate availability and fecundity selection in multi-allelic self-incompatibility systems in plants. *Evolution* **52**, 19-29.
- Vellend M (2005) Species diversity and genetic diversity: Parallel processes and correlated patterns. *American Naturalist* **166**, 199-215.
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* **10**, 249-256.
- Walther GR, Post E, Convey P, *et al.* (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**, 389-395.

- Wang Y, Wang QF, Guo YH, Barrett SCH (2005) Reproductive consequences of interactions between clonal growth and sexual reproduction in *Nymphoides peltata*: a distylous aquatic plant. *New Phytologist* **165**, 329-335.
- Ward M, Dick CW, Gribel R, Lowe AJ (2005) To self, or not to self ... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity* **95**, 246-254.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Welch DBM, Cummings MP, Hillis DM, Meselson M (2004) Divergent gene copies in the asexual class Bdelloidea (Rotifera) separated before the bdelloid radiation or within bdelloid families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1622-1625.
- Welch DM, Meselson M (2000) Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science* **288**, 1211-1215.
- Willi Y, Van Buskirk J, Fischer M (2005) A threefold genetic allee effect: Population size affects cross-compatibility, inbreeding depression and drift load in the self-incompatible *Ranunculus reptans*. *Genetics* **169**, 2255-2265.
- Wright S (1921) Systems of mating. *Genetics* **6**, 111-178.
- Wright S (1939) The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics* **24**, 538-552.
- Wright S (1969) *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press.

Annexes



L'arbre est devant la fenêtre. Je l'interroge chaque matin :

« Quoi de neuf aujourd'hui ? ».

La réponse vient sans tarder, donnée par des centaines de feuilles :

« Tout ».

Christian Bobin

Annexe 1

Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species — *Prunus avium* L.

SOLENN STOECKEL,*† JÉRÔME GRANGE,*† JUAN F. FERNÁNDEZ-MANJARRES,† ISABELLE BILGER,* NATHALIE FRASCARIA-LACOSTE† and STÉPHANIE MARIETTE*†§

*Cemagref, Unité de Recherche 'Ecosystèmes Forestiers', Domaine des Barres, 45290 Nogent-sur-Vernisson, France, †Université Paris XI, UMR 8079, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, Bât. 360, 91405 Orsay, France, ‡INIA, Unidad de Genética Forestal, CIFOR-INIA, Carretera de la Coruña Km 7.5, 28040 Madrid, Spain

Abstract

Wild cherry (*Prunus avium* L.), a partially asexual self-incompatible forest tree, shows heterozygote excess, which is a poorly studied phenomenon. In three natural populations, we found significant heterozygote excess at almost all investigated loci (eight microsatellites and markers for the self-incompatibility locus). We examined four hypotheses to account for this observed heterozygote excess. First, negative F_{IS} can result from a lack of selfed progeny in small populations of outcrossing species. A second explanation for negative F_{IS} is selection during the life cycle of the most heterozygous individuals. A third explanation is negative assortative mating when reproduction occurs between individuals bearing phenotypes more dissimilar than by chance. The last explanation for negative F_{IS} relies on asexual reproduction. Expectations for each hypothesis were tested using empirical data. Patterns of F_{IS} differed among loci. Nevertheless, our experimental results did not confirm the small sample size hypothesis. Although one locus is probably under a hitch-hiking effect from the *SI* locus, we rejected the effect of the self-incompatibility locus for the genome as a whole. Similarly, although one locus showed a clear pattern consistent with the selection of heterozygous individuals, the heterosis effect over the whole genome was rejected. Finally, our results revealed that clonality probably explains significant negative F_{IS} in wild cherry populations when considering all individuals. More theoretical effort is needed to develop expectations and hypotheses, and test them in the case of species combining self-incompatibility and partially asexual reproduction.

Keywords: asexual reproduction, gametophytic self-incompatibility, heterosis, negative F_{IS} , small breeding population, wild cherry tree

Received 5 October 2005; revision received 4 January 2006; accepted 30 January 2006

Introduction

Wright's fixation indexes (Wright 1921) are useful for understanding the evolutionary forces acting on populations. F_{IS} , the excess or deficit of heterozygotes observed within a population, varies markedly with mating systems and selection regime, i.e. whether selection favours homozygotes or heterozygotes (Wright 1969). Theoretical and empirical

studies have found heterozygote deficit to be due either to artefactual (null allele, short allele dominance, inappropriate sampling — population admixture Wahlund effect) or biological (inbreeding, positive assortative mating, selection against heterozygotes) causes. The origin of heterozygote excess, in contrast, remains poorly studied.

Heterozygote excess, revealed by negative F_{IS} , has several potential causes. It may result from small reproductive population size. When only few breeders contribute to the next generation, allelic frequencies can differ between male and female parents by chance alone (Rasmussen 1979; Pudovkin *et al.* 1996). This effect can be reinforced for loci with many rare alleles. Moreover, in small sexual or self-incompatible populations, the fact that individuals cannot

Correspondence: Solenn Stoeckel, Fax: 00 33 1 69 15 46 97; E-mail: solenn.stoeckel@ese.u-psud.fr.

§Present address: Unité de Recherche sur les Espèces Fruitières et la Vigne, INRA, Domaine de la Grande Ferrade, 71 Avenue Edouard Bourlaux, 33883 Villenave d'Ornon cedex France.

reproduce with themselves decreases the probability of creating homozygote offspring (Wright 1969; Balloux 2004).

A second explanation for heterozygote excess is overdominance. In the case of genuine overdominance, heterozygote excess should increase over the life cycle either because of progressive selection against deleterious recessive alleles revealed in homozygous state or selection favouring individuals bearing differing alleles (Mitton 1989). Associative overdominance will lead to heterozygote excess at nonselected loci that are closely linked to loci showing overdominance (Ohta & Kimura 1970; Nei 1987; Coulson *et al.* 1998). Under general overdominance resulting in heterosis or heterozygosity–fitness correlation (HFC), individual heterozygosity is correlated with components of individual survival (reviewed in David 1998; Hansson & Westerberg 2002).

Negative F_{IS} may also arise through negative assortative mating between individuals carrying different alleles. In this case, heterozygote excess should already be observable at the zygote stage. For example, some species possess kin recognition systems, such as the major histocompatibility complex (Tregenza & Wedell 2000; Lukas *et al.* 2004) or self-incompatibility systems (Hartl & Clark 1997; Glémin *et al.* 2001) that result in avoidance of consanguineous mating.

A fourth explanation for negative F_{IS} involves asexual reproduction (see Delmotte *et al.* 2002; Balloux *et al.* 2003; Alberto *et al.* 2005; Ruggiero *et al.* 2005; and references therein) that maintains heterozygosity or even increases it by mutation over generations (Judson & Normark 1996; Welch & Meselson 2000).

Wild cherry is a scattered forest tree species producing entomophilous and hermaphroditic flowers. Within populations, some genotypes propagate asexually by suckering. Trees thus produced are usually described as clones (see, for example, Namroud *et al.* 2005; Suvanto & Latva-Karjanmaa 2005). Wild cherry sexual reproduction is characterized by a gametophytic self-incompatible system which favours outcrossing. Previous studies on wild cherry trees have reported negative F_{IS} values (Frascaria *et al.* 1993; Ducci & Santi 1997). Authors hypothesized that negative F_{IS} values found in wild cherry populations could be due to the selection of the most heterozygous individuals (Ducci & Santi 1997), or to the fact that neutral loci could be closely linked to selected loci (Frascaria *et al.* 1993).

Here, we investigate which of the above list of hypotheses best explains negative F_{IS} at neutral loci in wild cherry populations. First, we analysed whether heterozygote excess could be due to small population size of non-self-fertile breeders. Second, we tested whether selection for linked heterozygotes or associative heterosis effect could cause negative F_{IS} in wild cherry. Subsequently we explored how the self-incompatibility system or asexuality could produce heterozygote excess at neutral loci.

Materials and methods

Field sampling

To study the fixation index, three French populations were analysed: St Gobain (49°37'N, 3°26'E), Pagny (47°01'N, 5°12'E) and Comté (45°30'N, 3°20'E). In both of the Pagny and Comté populations, we randomly sampled 50 adults. At the St Gobain site that comprised 22 ha within a large broad-leaved forest (total area: 6000 ha), we genotyped all 247 flowering wild cherry trees found. For each tree studied we sampled leaves and directly stored them in a portable ultra-cold freezer (–80 °C) for transportation to the laboratory where they were stored at –80° until DNA extraction.

To investigate change in heterozygote excess over the life cycle and to test a putative overdominant selection, we harvested two young stages in the St Gobain population. In 2002, 946 seeds were collected from 24 adult trees (from 18 to 74 seeds per tree) throughout the population area. Seeds were extracted from cherries, broken and the almonds were removed from the maternal tissue and stored at –20 °C in the laboratory until DNA extraction. In 2004, using the same method as for adults, we harvested leaves from 175 seedlings throughout the population area. To avoid sampling asexual suckers, each sampled seedling was pulled up and roots were checked.

Laboratory methods

Total genomic DNA samples were extracted from frozen leaves and almonds using DNeasy® QIAGEN 96 plant kit. Resulting DNA solutions were stored at –20 °C.

As genetic markers, we used a combination of eight microsatellites initially developed for other *Prunus* species and transferred to wild cherry (Table 1). Markers were chosen to

Table 1 Marker set used to genotype all individuals and position on the saturated *Prunus* map (Joobeur *et al.* 1998; Aranzana *et al.* 2003; Foulongne *et al.* 2003)

| Marker names | References | Linkage group |
|--------------|--|---------------|
| UDP96-005 | Cipriani <i>et al.</i> (1999) | G1 |
| BPPCT034 | Dirlewanger <i>et al.</i> (2002) | G2* |
| PCEGA34 | Downey & Iezzoni (2000) | G2 |
| UDP98-411 | Testolin <i>et al.</i> (2000) | G2 |
| BPPCT040 | Dirlewanger <i>et al.</i> (2002) | G4 |
| PS12A02 | Sosinski <i>et al.</i> (2000); Joobeur <i>et al.</i> (2000) | G4 |
| UDP98-021 | Testolin <i>et al.</i> (2000) | G6 |
| UDP98-412 | Testolin <i>et al.</i> (2000) | G6 |

*Position of BPPCT034 on the fourth linkage group was personally communicated by E. Dirlewanger.

cover a minimum of four linkage groups of the eight found in saturated linkage map studies (Aranzana *et al.* 2003; Dirlewanger *et al.* 2004). Sosinski *et al.* (2000) and Joobeur *et al.* (2000) both describe the same pair of primers amplifying the same marker but named it, respectively, PS12A02 and PS12E2. In order to study the effect of the self-incompatibility system on linked loci, two markers UDP98-021 and UDP98-412 closely linked, respectively, of 10 cm and 2 cm to the cluster of loci involved in the self-incompatibility system, located in the sixth linkage group, were chosen.

Microsatellite genotyping. DNA solution was sampled and diluted in polymerase chain reaction (PCR) solution composed of 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μM of reverse-primer, 0.18 μM of nonfluorescent forward primer, 0.02 μM of fluorescent marked forward-primer, 0.1 mM of each dNTP, 0.03 U/μL of *Taq* DNA polymerase.

Reaction cycles consisted of an initial denaturing of 5 min at 94 °C, then 35 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at specific primer temperature and 45 s at 72 °C, and a final extension time of 8 min at 72 °C. PCR products were aliquoted to represent 10% of a formamide solution and 3% specific sequencer ladder was added. Allele amplifications were separated and detected in 16 capillaries sequencer (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyser). Genotypes were visualized using GENOTYPER® and GENESCAN® software.

Compatibility group identification. Self-incompatibility genotypes were determined using three pairs of consensus primers developed by Sonneveld *et al.* (2003) and Sonneveld *et al.* (in press). Two pairs of primers amplify the first intron located in a stable part of the *Prunus* S-RNase gene while the third pair amplifies the second intron. Allele specific primer pairs were used when alleles could not be ascertained using this combination of three primers, as recommended by Sonneveld *et al.* (2003; in press).

Test of hypotheses

Calculations of F_{IS} . Weir & Cockerham F_{IS} (1984) values were calculated for each microsatellite in each adult and seed or seedling population using FSTAT software version 2.9.3.2 (Goudet 1995). Ninety-five per cent confidence intervals of F_{IS} estimates were obtained bootstrapping individuals 1000 times with resampling. Sample size abilities to estimate unbiased reliable F_{IS} values were checked using resampling method.

Test of hypothesis 1: small population size. In small populations, when few breeders participate in mating, allele frequencies between mating types can differ by chance alone. Therefore, resulting crosses occur more often between gametes bearing differing alleles (Rasmussen 1979; Pudovkin *et al.* 1996). Moreover, in self-incompatible species, no off-

spring are produced through selfing and in small populations this missing proportion of homozygotes due to the lack of selfed progeny is increasingly visible with decreasing population size. Combined effects of self-incompatibility and a small breeding population can significantly influence F_{IS} and can be the origin of heterozygote excess in the next generation (Balloux 2004). In this case, heterozygote excess should already be detectable from the seed stage. This hypothesis was tested only within the St Gobain population. We compared the F_{IS} value between the adult stage and the seed stage using Wilcoxon signed rank tests for paired comparison where the pairing criterion was the locus.

Test of hypothesis 2: existence of heterosis. If a heterosis effect exists, we expect a decrease in F_{IS} from the zygote to the adult stages (Bush & Smouse 1991; Coulson *et al.* 1999). We tested this hypothesis only in the St Gobain population. We calculated F_{IS} on three life cycle stages: seeds, seedlings and adults. All differences between age groups were tested using Wilcoxon signed rank tests for paired comparison where the pairing criterion was the locus implemented in MINITAB version 14.1 (Minitab Inc.).

Test of hypothesis 3: effect of the self-incompatibility system. In gametophytic self-incompatible (*SI*) species, a male factor is expressed from the *SI* allele carried by the haploid genome of each pollen grain. If a pollen grain lands on a pistil of an individual bearing the same allele in its diploid genome, recognition of the male factor by female receptors (S-RNase) activates cascade signalling, resulting in the inhibition of pollen tube growth. Fertilization ability of incompatible pollen is specifically blocked (Franklin-Tong & Franklin 2003). Consequently, all individuals are heterozygous at the *SI* locus and this may increase heterozygosity elsewhere in the genome (Hartl & Clark 1997). However, when effective population size is large, this effect is expected to be significant only at closely linked loci (Glémin *et al.* 2001).

In wild cherry, all genes directly involved in the self-incompatibility system are clustered at one tip of the sixth linkage group (Aranzana *et al.* 2003; Dirlewanger *et al.* 2004). Thus, under an *SI* effect, negative F_{IS} is expected at neutral loci only on the sixth linkage group. To test this hypothesis, we chose to genotype two microsatellite markers, UDP98-412 and UDP98-021, closely linked (2 cm and 10 cm, respectively) to *SI* (Aranzana *et al.* 2003; Foulongne *et al.* 2003; Dirlewanger *et al.* 2004). We compared F_{IS} values between the *SI* locus, UDP98-412, UDP98-021 and all other loci.

Test of hypothesis 4: effect of asexual reproduction. Following theoretical work of Balloux *et al.* (2003) and Halkett *et al.* (2005), three characteristics are expected in asexual or partially asexual populations: repeated genotypes, negative F_{IS} , and generalized linkage disequilibrium.

Table 2 Within-population polymorphism calculated for each population. Adult population values were calculated with all trees found including repeated genotypes (trees) and with only one individual per genotype (Genotypes). In the St Gobain population parameters were also calculated for different age classes

| | Expected heterozygosity | | | | | | | | Allelic richness | | | | |
|-----------------|-------------------------|-----------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------------------|--------|-----------|-----------|-------|
| | Comté | | Pagny | | St Gobain | | Juveniles | Seeds | Comté | Pagny | St Gobain | | |
| | Trees | Genotypes | Trees | Genotypes | Trees | Genotypes | | | Adults | Adults | Adults | Juveniles | Seeds |
| UDP96-005 | 0.771 | 0.780 | 0.757 | 0.756 | 0.760 | 0.763 | 0.786 | 0.743 | 7 | 5 | 5 | 10 | 5 |
| BPPCT034 | 0.711 | 0.700 | 0.699 | 0.723 | 0.736 | 0.762 | 0.684 | 0.755 | 8 | 8 | 11 | 10 | 12 |
| PCEGA34 | 0.835 | 0.844 | 0.846 | 0.852 | 0.757 | 0.793 | 0.794 | 0.778 | 8 | 11 | 15 | 14 | 21 |
| UDP98-411 | 0.457 | 0.522 | 0.740 | 0.752 | 0.600 | 0.639 | 0.542 | 0.600 | 5 | 6 | 6 | 7 | 7 |
| BPPCT040 | 0.748 | 0.799 | 0.708 | 0.722 | 0.773 | 0.768 | 0.760 | 0.769 | 8 | 4 | 7 | 8 | 7 |
| PS12A02 | 0.479 | 0.551 | 0.818 | 0.816 | 0.448 | 0.500 | 0.523 | 0.479 | 8 | 8 | 10 | 8 | 10 |
| UDP98-021 | 0.651 | 0.640 | 0.632 | 0.631 | 0.593 | 0.598 | 0.512 | 0.578 | 4 | 4 | 4 | 5 | 4 |
| UDP98-412 | 0.749 | 0.739 | 0.750 | 0.755 | 0.761 | 0.772 | NA | NA | 6 | 6 | 7 | NA | NA |
| <i>SI</i> locus | 0.867 | 0.909 | 0.907 | 0.877 | 0.893 | 0.918 | NA | NA | 13 | 10 | 18 | NA | NA |

Occurrence of asexual reproduction. We grouped individuals sharing the same multilocus genotype into clone patches. We estimated the probability that two individuals could possess the same multilocus genotype through sexual reproduction using two probability of identity estimators, an unbiased one $P_{(ID)Unbiased}$ (Paetkau *et al.* 1998) and one that considers that the population contains only full sibs $P_{(ID)Sib}$ (Eveit & Weir 1998) to generate an upper limit for the probability of obtaining identical genotypes through crossing, in this case, between related individuals (Waits *et al.* 2001). We calculated the total number of genotypes, the number of clonal patches, the number of genotypes represented by a single copy and the number of individuals (= ramets) per clonal patch. Observed proportion of asexual propagation in adult populations was calculated as $1 - (g/N)$, where g is the number of different genotypes and N the number of individuals.

Effect of asexual reproduction on F_{IS} . Ancient asexual lineages may be more heterozygous than sexual ones for several reasons (Judson & Normark 1996). First, old clonal genotypes should have accumulated independent neutral mutations over time. Second, heterozygosity cannot be lost through sexual recombination. Third, older genotypes have been exposed to selection over a longer time. If there is a fitness advantage to heterozygosity, the oldest genotypes should be more heterozygous.

If heterozygosity is preserved because of the absence of recombination and/or increased due to mutation accumulation through time heterozygote excess among suckering genotypes should be higher than among nonsuckering ones. To test whether negative F_{IS} was generated by an increase in H_O due to the overrepresentation of certain heterozygous genotypes because of clonality, we compared F_{IS} , H_O , H_E calculated on each member of the population

with that calculated using a single representative of each genotype using Wilcoxon signed rank tests for paired comparison.

Linkage disequilibria among loci. Genotypic disequilibrium was calculated for the St Gobain population. We tested linkage disequilibrium between loci after sequential Bonferroni multiple-comparison correction using *FSTAT* 2.9.3.2 (Goudet 1995).

Results

Marker polymorphism

Microsatellites and *SI* locus polymorphisms are given in Table 2. Concerning microsatellites, expected heterozygosity varied between 0.448 and 0.918 and total allelic richness between 4 and 21 alleles. As for the *SI* locus, expected heterozygosity varied between 0.867 and 0.918 and allelic richness between 10 and 18 alleles. At the *SI* locus, all genotyped individuals were heterozygotes.

Genetic departures from panmixia

The St Gobain population displayed four significant negative and one significant positive F_{IS} out of eight markers. The overall F_{IS} value was negative and significant. The Pagny population exhibited two significant negative F_{IS} values out of eight markers and the overall value was negative and significant. The Comté population showed one significant negative F_{IS} out of eight markers and the overall F_{IS} value was negative but not significant (Table 3).

Patterns of F_{IS} values locus by locus differed among populations. Three neutral loci, BPPCT034, PCEGA34, and UDP98-412, displayed negative F_{IS} values but only PCEGA34

Table 3 F_{IS} values observed in the three wild cherry populations. For each population, F_{IS} values were calculated with all trees found including repeated clone genotype and with only one individual per genotype (Genotypes). In parentheses, the 95% confidence interval of F_{IS} estimates is given. F_{IS} significant at the 5% level are marked with an asterisk (*)

| Marker | St Gobain | | Pagny | | Comté | |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | All trees found | Genotypes | All trees found | Genotypes | All trees found | Genotypes |
| UDP96-005 | (-0.2749, -0.1927) -0.233* | (-0.2567, -0.1072) -0.184* | (-0.1406, 0.1288) 0.004 | (-0.1941, 0.1733) 0.008 | (-0.2475, 0.0166) -0.115 | (-0.2700, 0.0210) -0.121 |
| BPPCT034 | (-0.2012, -0.0839) -0.141* | (-0.1531, 0.0238) -0.064 | (-0.2049, 0.0111) -0.087 | (-0.2718, -0.0031) -0.127* | (-0.2358, 0.0317) -0.097 | (-0.2826, 0.0436) -0.116 |
| PCEGA34 | (-0.1924, -0.0703) -0.130* | (-0.1217, 0.0522) -0.035 | (-0.2306, -0.0536) -0.133* | (-0.2604, -0.0147) -0.128* | (-0.2479, -0.1818) -0.198* | (-0.2461, -0.1684) -0.185* |
| UDP98-411 | (0.0534, 0.2171) 0.136* | (-0.0782, 0.1508) 0.037 | (-0.2944, -0.0197) -0.148* | (-0.2606, 0.1308) -0.045 | (0.0994, 0.5697) 0.344* | (0.0143, 0.5283) 0.281* |
| BPPCT040 | (-0.1437, -0.0308) -0.085* | (-0.1108, 0.0659) -0.024 | (-0.1542, 0.1866) 0.014 | (-0.2814, 0.185) -0.038 | (-0.2695, -0.0455) -0.146* | (-0.2698, -0.0176) -0.130* |
| PS12A02 | (0.0046, 0.1406) 0.074 | (-0.0194, 0.1975) 0.087 | (-0.2086, 0.0281) -0.081 | (-0.3095, -0.0039) -0.134* | (-0.0896, 0.3214) 0.123 | (-0.1488, 0.3185) 0.092 |
| UDP98-021 | (-0.2108, -0.0746) -0.144* | (-0.1688, 0.048) -0.058 | (-0.2806, 0.1131) -0.074 | (-0.2579, 0.329) 0.038 | (0.0595, 0.4824) 0.262* | (-0.1091, 0.3772) 0.121 |
| UDP98-412 | (-0.1631, -0.0536) -0.108* | (-0.1990, -0.0527) -0.120* | (-0.1751, 0.0468) -0.057 | (-0.2597, 0.0581) -0.088 | (-0.2765, -0.0864) -0.174* | (-0.2477, 0.0367) -0.100 |
| All microsatellites | (-0.1028, -0.0590) -0.092* | (-0.0812, -0.0202) -0.052* | (-0.1349, -0.0264) -0.072* | (-0.01468, -0.0136) -0.068* | (-0.0555, 0.0303) -0.033 | (-0.0916, 0.0124) -0.042 |
| <i>SI</i> locus | (-0.1375, -0.1086) -0.120* | (-0.1065, -0.0833) -0.089* | (-0.1983, 0.1385) -0.154* | (-0.2025, -0.1237) -0.140* | (-0.1357, -0.0977) -0.103* | (-0.1505, -0.0912) -0.100* |

Table 4 F_{IS} values observed for seeds and seedlings at St Gobain. In parentheses, the 95% confidence interval of F_{IS} estimates is given. No value is significant at the 5% level

| Markers | Seeds | Seedlings |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP96-005 | (-0.0356, 0.0333) -0.000 | (-0.1196, 0.0564) -0.027 |
| BPPCT034 | (-0.0254, 0.0375) 0.006 | (-0.0909, 0.1301) 0.021 |
| PCEGA34 | (-0.0181, 0.0479) 0.016 | (-0.0180, 0.1722) 0.081 |
| UDP98-411 | (-0.0780, 0.0084) -0.032 | (-0.2819, 0.0071) -0.141 |
| BPPCT040 | (-0.0004, 0.0707) 0.036 | (-0.0074, 0.2147) 0.098 |
| PS12A02 | (-0.0578, 0.0055) -0.027 | (-0.1117, 0.0789) -0.019 |
| UDP98-021 | (-0.0248, 0.0604) 0.015 | (-0.0638, 0.1807) 0.063 |
| UDP98-412 | NA | NA |
| All microsatellites | (-0.0131, 0.0164) 0.004 | (-0.031, 0.048) 0.017 |
| <i>SI</i> locus | NA | NA |

and the *SI* locus exhibited significant heterozygote excess in the three populations. The five other loci showed either negative or positive values.

Test of hypothesis 1: small population size

Seeds' and juveniles' F_{IS} in the St Gobain population are given in Table 4. In seeds and juveniles no locus displayed significant heterozygote excess. Overall, seeds and juveniles showed no significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium (Table 4).

Test of hypothesis 2: existence of heterosis

No significant difference was detected in F_{IS} values between seeds, juveniles and adults when considering only one genotype per clonal patch ($P > 0.447$; Wilcoxon paired-sample test). Changes in F_{IS} values across development stages differed among loci. For UDP96-005 the F_{IS} value clearly decreased. PCEGA34, BPPCT040 and UDP98-021

also showed a tendency to decrease in F_{IS} but only between juvenile and adult stages. On the contrary, for PS12A02 and UDP98-411 F_{IS} values increased between juvenile and adult stages.

Test of hypothesis 3: effect of the self-incompatibility system

The *SI* locus presented significant negative F_{IS} with and without repeated genotypes (Table 3). In each adult population, some neutral loci showed higher F_{IS} than did the *SI* locus although this was not the case for all (see Table 3).

Test for the asexual reproduction effect

Occurrence of asexual propagation. The upper and lower bound of the probability of identity calculated from the eight microsatellites genotypes in the St Gobain population were, respectively, $P_{(ID)Unbiased} = 3.6 \times 10^{-8}$ and $P_{(ID)Sib} = 1.2 \times 10^{-3}$. $P_{(ID)}$ values indicated that individuals sharing the same genotype for eight microsatellites in the three populations had less than 0.117% chance to result from sexual reproduction.

In the St Gobain population clone patches contained from 2 to 34 identical individuals (Table 5). The observed proportion of asexual propagation in the adult population was 0.53. In the Comté and Pagny populations, the number of trees per clone patch ranged from 2 to 5. Clone patches were comparatively numerous but composed of fewer individuals.

Overall in the three populations more than half the trees belonged to a clone group. Consequently the observed proportion of asexual propagation in the adult population was close to 0.5.

Effect of asexual reproduction on F_{IS} . F_{IS} values were larger when based on a single representative per genotype than when based on the entire population except at Pagny. When analysing a single individual per clone most F_{IS} values showed no significant departure from zero (Table 3).

Calculating F_{IS} using data from all trees found in a population increased heterozygote excesses slightly but not significantly ($P > 0.155$; Wilcoxon paired-sample test). Observed heterozygosity when taking into account all

Table 5 Description of the three wild cherry populations

| Marker | St Gobain (all) | Pagny | Comté |
|--|-----------------|----------|----------|
| Number of individuals | 247 | 53 | 50 |
| Number of genotypes (rate of clonal reproduction) | 117 (53%) | 28 (47%) | 32 (36%) |
| Number of clonal patches (percentage of genotypes) | 34 (29%) | 11 (34%) | 11 (32%) |
| Number of genotypes not included in a clone | 82 | 21 | 23 |
| Median number of ramets per clonal patch (min-max) | 3 (2-34) | 2 (2-5) | 2 (2-3) |

Table 6 P value for linkage disequilibrium based on 720 permutations. Adjusted P value for tablewise 5% is 0.00139. Loci studied are categorized by linkage group and significant values are marked with an asterisk (*)

| Linkage group | Marker | UDP96-005 | BPPCT034 | PCEGA34 | UDP98-411 | BPPCT040 | PS12A02 | UDP98-021 | UDP98-412 | <i>SI</i> locus |
|---------------|-----------------|-----------|----------|---------|-----------|----------|---------|-----------|-----------|-----------------|
| 1 | UDP96-005 | — | | | | | | | | |
| 2 | BPPCT034 | 0.00139* | — | | | | | | | |
| 2 | PCEGA34 | 0.00139* | 0.05556 | — | | | | | | |
| 2 | UDP98-411 | 0.00139* | 0.01389 | 0.25972 | — | | | | | |
| 4 | BPPCT040 | 0.16250 | 0.08611 | 0.10694 | 0.00278 | — | | | | |
| 4 | PS12A02 | 0.00278 | 0.31806 | 0.03611 | 0.00972 | 0.13194 | — | | | |
| 6 | UDP98-021 | 0.02500 | 0.00694 | 0.24444 | 0.00139* | 0.00694 | 0.26806 | — | | |
| 6 | UDP98-412 | 0.00139* | 0.01389 | 0.00556 | 0.00139* | 0.00278 | 0.04306 | 0.01250 | — | |
| 6 | <i>SI</i> locus | 0.00417 | 0.00139* | 0.03472 | 0.00139* | 0.00139* | 0.00278 | 0.00139* | 0.00139* | — |

repeated genotypes did not differ from observed heterozygosity without repeated genotypes ($P = 0.722$; Wilcoxon paired-sample test). On the other hand, expected heterozygosity was significantly reduced when taking all repeated genotypes into account ($P = 0.033$; Wilcoxon paired-sample test).

Finally, the average value of observed heterozygosity did not differ between clonal [0.735 ± 0.132 (SD, $n = 34$)] and nonclonal genotypes [0.739 ± 0.149 (SD, $n = 82$); $F_{1,114} = 0.02$, $P = 0.901$].

Linkage disequilibria between loci. With 36 comparisons the critical α value was 0.00139. When taking all repeated genotypes into account, all pairwise combinations of loci presented significant linkage disequilibrium. When retaining only one genotype per clonal patch, 13 significant linkage disequilibria were detected (Table 6).

Discussion

Consistent with findings of Ducci & Santi (1997) and Frascaria *et al.* (1993) using isozyme markers on other forest wild cherry populations, we found significant excesses in heterozygotes as measured by F_{IS} in three studied populations. We discuss hereafter the possible role of a small number of breeders, heterosis, self-incompatibility system, and asexual reproduction on the value of this parameter.

Small population size

Self-incompatible species produce no offspring through selfing. In small populations, this can lead to a significant deviation from random mating, significantly influence F_{IS} and generating heterozygote excess (Balloux 2004). Were this the case in our populations we would expect visible heterozygote excess right from the zygote stage. However, because seeds and juveniles showed no departure from Hardy–Weinberg equilibrium expectations and did not

present heterozygote excess tendencies, we rejected the hypothesis that F_{IS} could result from a small number of breeders.

Overdominant selection favouring heterozygote survival (heterosis)

Faced with heterozygote excess found only in adult populations, we explored if it could be explained by associative overdominance (Mitton 1989; David 1998).

Early and convergent studies have reported that some species are prone to heterosis (Hansson & Westerberg 2002). For example in trees, outcrossed zygotes grow faster and have lower mortality than selfed progenies (Cheliak *et al.* 1985; Bush & Smouse 1991). As a result, older individuals present higher heterozygosity than juveniles or seeds because of selective loss of the most homozygous (Bush & Smouse 1991; references in Doligez & Joly 1997). Strobeck (1979) showed that loci with heterozygotic advantage may induce an excess of heterozygotes at all other neutral loci of the genome. As a consequence, previous authors, Ducci & Santi (1997) and Frascaria *et al.* (1993), hypothesize that negative F_{IS} values found in wild cherry are due to selection for heterozygotes with hitch-hiking.

Under such a hypothesis, we would expect a progressive decrease in F_{IS} from seeds to adults. In addition, higher heterozygosity might be expected in genotypes performing asexual propagation because they could persist in populations over the course of several sexual generations (DesRochers & Lieffers 2001; Bond & Midgley 2001). We found that although F_{IS} averaged across loci was zero in seeds and seedlings and negative in mature trees at St Gobain, this difference among the three groups was not significant. Interestingly, patterns differed among loci. In the St Gobain population, UDP96-005 F_{IS} value clearly decreased across the development stages thus displaying a pattern corresponding to heterosis. Three other loci, PCEGA34, BPPCT040 and UDP98-021, out of eight also showed a tendency to

decrease in F_{IS} but only between juvenile and adult stages. On the contrary, PS12A02 and UDP98-411 F_{IS} values increased between juvenile and adult stages. Moreover, UDP96-005, BPPCT040 and UDP98-021 displayed positive values in other adult populations. Consequently, we could not conclude that the populations endured a global selection favouring the survival of the most heterozygous individuals over the lifetime.

Avoidance of related mating (self-incompatibility system effect)

Another common explanation for observing heterozygote excess is negative assortative mating or active avoidance of self and consanguineous mating (Storz *et al.* 2001). Self-incompatibility systems are cited by Hartl & Clark (1997) as a possible cause of heterozygote excess in plants. Storz *et al.* (2001) found in the bat *Cynopterus sphinx* that all or most matings occur between an immigrant male drawn from one matriline and multiple females composing a genetically distinct matriline. In this case, the magnitude of departure from Hardy–Weinberg expectations in the direction of heterozygote excess is directly proportional to the genetic variance between matriline (Chesser 1991).

In wild cherry, all the genes known to be directly involved in the self-incompatibility system are clustered at the end of the sixth linkage group (Dirlewanger *et al.* 2004; Ushijima *et al.* 2004). Even though such effect is expected at neutral linked loci, a theoretical study demonstrated no or minor effects of self-incompatibility at unlinked neutral loci, especially when the number of self-incompatibility alleles or population size is high (more than four alleles or $N > 25$, Glémin *et al.* 2001; Balloux 2004). None of the three studied populations is small, and we have already shown that negative F_{IS} found in adult populations were not due to small populations of breeders. Furthermore, all adult populations harboured far more than four *SI* alleles. Therefore we focused on the two microsatellite loci genotyped on the sixth linkage group, near to *SI* locus. UDP98-412, located at 2 cm from the *SI* locus, showed F_{IS} values very close to the *SI* locus values. On the contrary, although UDP98-021 showed negative F_{IS} value in the St Gobain population, at 10 cm from the *SI* locus, it also displayed positive F_{IS} values in the Comté and Pagny populations. We concluded that the *SI* locus probably had a hitch-hiking effect on UDP98-412, but not on UDP98-021. Both empirical results confirmed the expectations predicted by the theoretical work of Glémin *et al.* (2001). Thus, we rejected a direct overall effect of the self-incompatibility system for at least seven out of the eight genotyped loci. However, we confirmed, with empirical data, that when the population number of *SI* alleles is high, the *SI* locus probably influences heterozygote excesses only at closely linked neutral loci.

Proportion of asexual reproduction

The three populations showed repeated multilocus genotypes. Given the probabilities of identity calculated, there was little chance that such repeated genotypes came from sexual events. Consequently, the three populations showed evidence of partially asexual propagation. Overall, we found that more than half of the trees belonged to suckering patches. These values were comparable to previous ones published by Frascaria *et al.* (1993) and Ducci & Santi (1997). In the Comté and Pagny populations, clone patches grouped fewer trees than observed in the St Gobain population. This difference may be due to adults being randomly sampled in the Comté and Pagny populations contrary to St Gobain where all adults were exhaustively genotyped. In St Gobain, some genotypes had only one representative whereas others had many. Asexual propagation seemed to vary among genotypes and spatial position. As a result, small or local samples could falsely estimate global population clonality. For example, Ducci & Santi (1997) found that 34 of 36 individuals genotyped belonged to a single clone (observed asexual propagation of 0.94). On the contrary, samples taken on the fringes of clone patches may lead to under-estimation of population clonality.

Effect of clonal reproduction on the number of heterozygotes (asexuality effect)

In plants, individuals resulting from rhizomes, sprouts or suckering roots are generally considered as clones (e.g. see Bond & Midgley 2001; Bottin *et al.* 2005; Jacquemyn *et al.* 2005). Even though such 'clonal' individuals initiate new structural roots shortly after suckering, they may stay functionally connected to the parent root over their life. However, suckering genotypes can persist over the course of several generations of nonsuckering ones, even if the original mother tree is dead (DesRochers & Liefers 2001). As most European forests, the studied forests have experienced human activities and management for generations. The traditional management method (coppice-with-standards method) has probably favoured the maintenance of clonal lineages through time. In this study, it is then not possible to compare F_{IS} values between clonal and sexual lineages. However, we found that F_{IS} values were lower when considering all individuals including suckering repeated genotypes. In addition, we detected linkage disequilibrium between some markers on different linkage groups. Negative F_{IS} and genome-wide linkage disequilibria are signatures of asexual reproduction, which preserves allelic associations over generations (Halkett *et al.* 2005). Consequently, when considering all trees found, significant negative F_{IS} could be explained by asexual reproduction.

In the case of clonal reproduction, we should also expect that suckering genotypes may have accumulated somatic

mutations over their lifespan (Judson & Normark 1996; Lamont & Wiens 2003). We found that genotypes performing asexual reproduction were not significantly more heterozygous than were genotypes represented by a single individual. In wild cherry, asexual reproduction seemed not to result in mutation accumulation as observed in some other species (Delmotte *et al.* 2002). However, we had no information about the genotype histories and the mechanism leading some trees to propagate asexually. As a consequence, we cannot exclude that some observed unique genotypes may represent individuals derived from a clone patch but bearing mitotic mutations or may be the last specimens of an ancient clonal patch.

Although the proportions of asexual reproduction found in wild cherry populations varied from 0.32 and 0.53 of all adults belonging to a clonal patch, observed F_{IS} are consistent with far greater clonality. Such strongly negative F_{IS} are only predicted for levels of clonality approaching 1 (Balloux *et al.* 2003). In *Schistosoma mansoni*, Prugnolle *et al.* (2005) suggest that the variance in reproductive success of clones shapes the distribution of genetic variability in populations. In *Populus tremula*, where the mean size of clonal patches is three individuals (maximum of 12), Suvanto & Latva-Karjanmaa (2005) find only three loci of nine with heterozygote excesses when calculating it on all the trees sampled. In the St Gobain population, the size of clonal patches varied between 2 and 34 individuals from genotype to genotype while we found six loci out of eight showing significant heterozygote excess. Variance of asexual reproduction among individuals and among generations may result in heterozygote excesses that we observed in our populations. Nevertheless, more theoretical effort is needed to develop expectations and hypotheses for partially clonal perennial plant populations.

To conclude, we reject the hypothesis that a small population of breeders, heterosis, or a global effect of the *SI* locus on unlinked neutral loci could lead to the heterozygote excesses found in our adult wild cherry populations. We demonstrated that the significant negative F_{IS} values that we observed when considering all trees can be explained by asexual propagation in wild cherry populations. Nevertheless, we showed that F_{IS} patterns differed among loci and among populations, and we could not exclude heterosis effect for one locus in the St Gobain population. Furthermore, the neutral locus most closely linked to the *SI* locus showed evidence of a hitch-hiking effect from *SI*. This may explain why the overall F_{IS} value remains significantly negative even when considering only unique genotypes. Finally, self-incompatibility systems and partially asexual propagation are common traits for many species, especially plants (De Nettancourt 2001; Honnay & Bossuyt 2005), but we still poorly understand how these two traits shape the genetic structure of natural populations.

Acknowledgements

We thank Marie-Claude Lesage-Descause for her help running microsatellites on the sequencing machine and Jacqui Shykoff for helpful comments on earlier versions of the manuscript and language reviewing. This work was financially supported by the Bureau des Ressources Génétiques and a PhD grant from Région Centre and Cemagref.

References

- Alberto F, Gouveia L, Arnaud-Haond S *et al.* (2005) Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. *Molecular Ecology*, **14**, 2669–2681.
- Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P *et al.* (2003) A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**, 819–825.
- Balloux F (2004) Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution*, **58**, 1891–1900.
- Balloux F, Lehmann L, de Meeus T (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics*, **164**, 1635–1644.
- Bond WJ, Midgley JJ (2001) Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 45–51.
- Bottin L, Verhaegen D, Tassin J *et al.* (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular Ecology*, **14**, 1979–1989.
- Bush RM, Smouse PE (1991) The impact of electrophoretic genotype on life-history traits in *Pinus taeda*. *Evolution*, **45**, 481–498.
- Cheliak WM, Dancik BP, Morgan K, Yeh FCH, Strobeck C (1985) Temporal variation of the mating system in a natural-population of jack pine. *Genetics*, **109**, 569–584.
- Chesser RK (1991) Gene diversity and female philopatry. *Genetics*, **127**, 437–447.
- Coulson T, Albon S, Slate J, Pemberton J (1999) Microsatellite loci reveal sex-dependent responses to inbreeding and outbreeding in red deer calves. *Evolution*, **53**, 1951–1960.
- Coulson TN, Pemberton JM, Albon SD *et al.* (1998) Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **265**, 489–495.
- David P (1998) Heterozygosity–fitness correlations: new perspectives on old problems. *Heredity*, **80**, 531–537.
- De Nettancourt D (2001) *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*, 2nd edn. Springer, Berlin.
- Delmotte F, Leterme N, Gauthier JP, Rispe C, Simon JC (2002) Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**, 711–723.
- DesRochers A, Lieffers VJ (2001) The coarse-root system of mature *Populus tremuloides* in declining stands in Alberta, Canada. *Journal of Vegetation Science*, **12**, 355–360.
- Dirlwanger E, Graziano E, Joobeur T *et al.* (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **101**, 9891–9896.
- Doligez A, Joly HI (1997) Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. *Heredity*, **79**, 72–82.
- Ducci F, Santi F (1997) The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*). *Canadian Journal of Forest Research*, **27**, 1998–2004.

- Evetts IW, Weir BS (1998) *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Foulongne M, Pascal T, Arus P, Kervella J (2003) The potential of *Prunus davidiana* for introgression into peach *Prunus persica* (L.) Batsch assessed by comparative mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 227–238.
- Franklin-Tong N, Franklin FCH (2003) Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science*, **8**, 598–605.
- Frascaria N, Santi F, Gouyon PH (1993) Genetic differentiation within and among populations of chestnut (*Castanea sativa* Mill) and wild cherry (*Prunus avium* L.). *Heredity*, **70**, 634–641.
- Glémin S, Bataillon T, Ronfort J, Mignot A, Olivieri I (2001) Inbreeding depression in small populations of self-incompatible plants. *Genetics*, **159**, 1217–1229.
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Halkett F, Simon JC, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 194–201.
- Hansson B, Westerberg L (2002) On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2467–2474.
- Hartl D, Clark A (1997) *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Honnay O, Bossuyt B (2005) Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? *Oikos*, **108**, 427–432.
- Jacquemyn H, Brys R, Honnay O, Hermy M, Roldan-Ruiz I (2005) Local forest environment largely affects below-ground growth, clonal diversity and fine-scale spatial genetic structure in the temperate deciduous forest herb *Paris quadrifolia*. *Molecular Ecology*, **14**, 4479–4488.
- Joobeur T, Periam N, Vicente MC, King GJ, Arus P (2000) Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers. *Genome*, **43**, 649–655.
- Judson OP, Normark BB (1996) Ancient asexual scandals. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, A41–A46.
- Lamont BB, Wiens D (2003) Are seed set and speciation rates always low among species that resprout after fire, and why? *Evolutionary Ecology*, **17**, 277–292.
- Mitton JB (1989) Physiological and demographic variation associated with allozyme variation. In: *Isozymes in Plant Biology* (eds Soltis DE, Soltis PS), pp. 87–105. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Namroud M-C, Park A, Tremblay F, Bergeron Y (2005) Clonal and spatial genetic structures of aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Molecular Ecology*, **14**, 2969–2980.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Ohta T, Kimura M (1970) Development of associative overdominance through linkage disequilibrium in finite populations. *Genetical Research*, **16**, 165–177.
- Paetkau D, Waits LP, Clarkson PL *et al.* (1998) Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology*, **12**, 418–429.
- Prugnolle F, Roze D, Theron A, De Meeus T (2005) *F*-statistics under alternation of sexual and asexual reproduction: a model and data from schistosomes (platyhelminth parasites). *Molecular Ecology*, **14**, 1355–1365.
- Pudovkin AI, Zaykin DV, Hedgecock D (1996) On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*, **144**, 383–387.
- Rasmussen DI (1979) Sibling clusters and genotypic frequencies. *American Naturalist*, **113**, 948–951.
- Ruggiero MV, Reusch TBH, Procaccini G (2005) Local genetic structure in a clonal dioecious angiosperm. *Molecular Ecology*, **14**, 957–967.
- Sonneveld T, Tobutt KR, Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 1059–1070.
- Sonneveld T, Robbins T, Tobutt K (in press) Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron PCR products. *Plant Breeding*.
- Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD *et al.* (2000) Characterization of microsatellite markers in peach *Prunus persica* (L.) Batsch. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 421–428.
- Storz JF, Bhat HR, Kunz TH (2001) Genetic consequences of polygyny and social structure in an Indian fruit bat, *Cynopterus sphinx*. I. Inbreeding, outbreeding, and population subdivision. *Evolution*, **55**, 1215–1223.
- Strobeck C (1979) Partial selfing and linkage: the effect of a heterotic locus on a neutral locus. *Genetics*, **92**, 305–315.
- Suvanto LI, Latva-Karjanmaa TB (2005) Clone identification and clonal structure of the European aspen (*Populus tremula*). *Molecular Ecology*, **14**, 2851–2860.
- Tregenza T, Wedell N (2000) Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review. *Molecular Ecology*, **9**, 1013–1027.
- Ushijima K, Yamane H, Watari A *et al.* (2004) The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant Journal*, **39**, 573–586.
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology*, **10**, 249–256.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Welch DM, Meselson M (2000) Evidence for the evolution of bdelloid rotifers without sexual reproduction or genetic exchange. *Science*, **288**, 1211–1215.
- Wright S (1921) Systems of mating. *Genetics*, **6**, 111–178.
- Wright S (1969) *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

This study is part of Solenn Stoeckel's PhD research on genetic diversity and gene flow in *Prunus avium* L. J. Grange and I. Bilger are involved in field and laboratory analyses of forest tree species. J. F. Fernández-Manjarres' interests are the genetic structure of tree species and the use of statistical tools in population genetics. The work was supervised by N. Frascaria-Lacoste and S. Mariette. Both of them are interested in forest tree population and conservation genetics.

Annexe 2

Allee effect and plant evolutionary ecology and conservation

LE CADRE Solenn*¹, BESSA-GOMES Carmen², STOECKEL Solenn³, MORET Jacques¹ and MACHON Nathalie^{1,4}

¹ Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien, USM Inventaire et Suivi de la Biodiversité, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue Buffon, F-75005 Paris, France

² Laboratoire Ecologie des Populations et Communautés, Institut national agronomique Paris-Grignon, 16, rue Claude Bernard, F-75231 Paris cedex 05, France

³ Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, Bat. 360, 1er étage, porte 302, Université Paris Sud, 91405 ORSAY Cedex, France

⁴ Unité Conservation des Espèces, Restauration et Suivi des Populations, UMR 5173, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue Buffon, F-75005 Paris, France

Tel. +33 1 40 79 38 71, Fax. +33 1 40 79 35 53

Email : lecadre@mnhn.fr

* Author to whom correspondence should be addressed.

ABSTRACT

First described more than 50 years ago by Warder C. Allee, the existence of a positive relation between density and growth rate were long overlooked due to difficulty of detecting it in natural populations. Nevertheless, the growing concern with extinction dynamics and particularly the emergence of the small populations paradigm brought the Allee effects to the limelight. In recent years, the Allee effect has been the object of several studies that have examined its impact on population dynamics, and its implications for problems as diverse as the evolution of cooperation, predator-prey interactions, invasive species and biological control.

Because Allee effects are likely to occur when conspecifics play an important role in ensuring survival or reproduction, recent research has focused mainly in animal systems. Nevertheless, component Allee effects are equally likely to impact plants and that many of the behavioural mechanisms above mentioned have their counter-parts in plants. Indeed, plants offer us some of the clearest examples of Allee effect due to breeding limitation.

In this article we start by reviewing the current literature on Allee effects in plants, including genetic Allee effects; we then expand to other aspects of plant ecology that may give rise to an Allee effect, either through increased individual predation risk, reduced defence or due to interspecific competition or inefficient resource exploitation. We hope with this article to illustrate the ubiquity of Allee effects, and that it may contribute to raise the awareness of plant ecologist for the phenomenon and thus further its study in plants. Moreover, this synthesis supports the need for research at the interface between the ecological and evolutionary consequences of Allee effects. Hence, we think that this research will not only increase our current understanding of plant evolutionary ecology and conservation, but also our general understanding of the Allee effects.

INTRODUCTION

First described more than 50 years ago by Warder C. Allee (Allee 1949), the existence of a positive relation between density and growth rate (i.e. an Allee effect) as long remained an eccentricity concept, regarded as an intriguing phenomenon of little consequence for natural populations. In support of such view was the apparent lack of empirical evidence of Allee effect on growth rates of natural population (but see Kuussaari *et al.* 1998; Morris 2002). However, an alternative explanation for such lack of evidence is that the Allee effect on growth rates remains a phenomenon difficult to observe because populations affected tend to go extinct (Stephens and Sutherland 1999). This alternative explanation allows us to reconsider the Allee effect in a different light, and the growing concern with extinction dynamics and particularly the emergence of the small populations paradigm brought the Allee effects to the limelight (Stephens and Sutherland 1999; Courchamp *et al.* 1999). In recent years, the Allee effect has thus been the object of several studies that have examined its impact on population dynamics (Fowler and Rouxton 2002; Amarasekare 1998) and extinction risk (Dennis 1989), along with its implications for problems as diverse as the evolution of cooperation (Aviles 1999), predator-prey interactions (Petrovskii *et al.* 2002; De Roos *et al.* 2003), invasive species (Liebhold and Bascompte 2003; Cappuccino 2004) and biological control (Freckleton 2000).

A key aspect for the reappraisal of Allee effects was the distinction between demographic and component Allee effects (Stephens *et al.* 1999). Formerly Allee effects were thought-of as a demographic phenomenon that affects the overall population growth rate, overlooking the underlying mechanisms. In reality, Allee effects operate through different components of individual fitness. The extent to which such impact translates in a decline of the growth rate depends on the life-history, rendering it hard to detect in some cases. Nonetheless, component Allee effects influence individual fitness and thus affect the selective

value of inter-individual interactions because whenever the interaction among conspecifics promotes their survival or reproduction, there is potential for an Allee effect at low densities. Hence, Allee effects are likely to affect social species (in the broad sense) (Stephens and Sutherland 1999; Aviles 1999).

The appreciation of the importance of component Allee effects has led researchers to centre their attention on the underlying behavioural mechanisms, particularly on breeding systems and group living. This has led to a focus in animal systems. Nevertheless, component Allee effects are equally likely to impact plant species and many of the behavioural mechanisms above mentioned have their counter-parts in plants. Indeed, many examples of Allee effects on plants have been described insofar (Davis *et al.* 2004a; Hackney and McGraw 2001). In this article we review the current literature on Allee effects in plants and point out additional circumstances where an Allee effect is likely to occur. We hope by this to contribute to our current understanding of Allee effects and also to stimulate further research on Allee effects plants.

One of the main ideas raised by the Allee paradigm is that individual fitness could not be estimated properly apart from his population context.

PLANT BREEDING SYSTEMS AND THE ALLEE EFFECT

The impossibility of finding a mate at low densities is likely the most often mentioned cause for Allee effects. This hypothesis was advanced by W. C. Allee himself and has ever since been the object of several studies. Generally, breeding limitation at low density has been attributed to the difficulty in finding a partner, to the inability to mate with the available partners, and to the reduced mating success if mated with unsuitable partners (Bessa-Gomes *et al.* 2003; Møller and Legendre 2001). Although often neglected in the Allee effects

literature, plants offer, in fact, some of the best examples of all three types of breeding limitation at low density.

DIFFICULTIES IN FINDING A PARTNER: DECREASED POLLINATION SUCCESS AT LOW DENSITY

Because of their motionlessness, plants reproduction success is highly dependent of their spatial distribution and of the efficiency of the pollen vectors. Most flowering plants required wind or animals (insects or birds) for their fertilization. Pollen grains are released, transported and deposited on a receptive stigma of a different plant (allogamy) or of a same plant (geitonogamy). It has been shown that the majority of plants, at least at times, exhibit pollination failure (Wilcock and Neiland 2002), implying that stigmas received insufficient pollen to fertilize all available ovules and fruit or seed production is reduced (Larson & Byers 2000; Ashman *et al.* 2004; Knight *et al.* 2005).

Pollen from wind-pollinated species has traditionally been assumed to be abundant and to travel long distances (Koenig and Ashley 2003). However, the efficiency of wind pollination is generally assumed to decrease as the concentration of airborne pollen decreases (Regal 1982; Whitehead 1983). Experimental studies have shown that at low population density, concentration of airborne pollen is too low to fertilize all ovules (Wilcock and Neiland 2002). In blue oaks (*Quercus douglasii*), Knapp *et al.* (2001) found a positive association between the density of pollen-producing neighbors and acorn production. In *Taxus Canadensis*, supplemental pollination increased the proportion of filled seeds in low-density populations but not at high-densities (Allison 1990b). Some other species have also displayed positive correlation between population density and the proportion of filled seeds (e.g. Nilsson and Wastljung 1987; Smith *et al.* 1988; Allison 1990a in respectively *Fagus sylvatica*, *Pinus contorta* and *Taxus canadensis* populations). Moreover, unfavorable weather conditions for pollen dispersal can decrease the concentration of airborne pollen and amplify the pollination failure found in small populations (Wilcock and Neiland 2002). *Betula*

populations growing at high elevations where tree densities are low and weather conditions unfavorable display lower seed set than ones growing at higher densities or in valleys (Holm 1994).

The Allee effect on pollination rate is even more striking in animal pollinated plants. The reproductive success of these plants is largely determined by the number and the foraging behavior of pollinators (bats, birds, Insects,...). Foraging theory predicts that animals will visit flowers in the most energetically efficient manner (Pyke 1978a,b, 1979, 1980, 1982; Pyke *et al.* 1977; Krebs 1978). For pollen vectors, the spatial repartition of entomophilous flowers can be seen as patchy environment where each patch is characterized by its density and its degree of isolation from the other patches (Osborne and Williams 2001). According to the marginal value theorem (Charnov 1976) the time pollinators should spend foraging in a patch increases with the profitability of that patch compared to other patches (Cowie 1977; Pyke 1984; Zimmerman 1981; Best and Bierzychudek 1982; Hodges 1985; Pleasants 1989). Observations show that patches of small density of flowering plants, which provided less rewards to pollinators than higher patches, are less attractive for pollinators and so less visited than gregarious or higher density patches (Schaal 1978; Thomson 1981; Sih and Baltus 1987; Klinkhamer and de Jong 1990; Kunin 1993, 1997). For exemple, Steffan-Dewenter and Tschardt (1999) have experimentally shown that abundance and species richness of flower-visiting bees decrease when the local number of plants decreases.

Consequently, when the number of individuals in the population decreases or when the inter-individual distance increases, plant reproduction may suffer from a lack of pollen transfer. Gametes joining diminish and seed set is reduced (e.g. Groom 1998; Matsumura and Washitani 2000).

Thus, growing at low density (Silander 1978; Thomson 1981; Feinsinger *et al.* 1986; Klinkhamer *et al.* 1989; Feinsinger *et al.* 1991; Kunin 1992, 1993; Bosch and Waser 1999 but

see Schmitt 1983) or in small populations (Sih and Baltus 1987; Jennersten and Nilsson 1993; Lamont *et al.* 1993; Widén 1993; Aizen and Feinsinger 1994; Ågren 1996; Groom 1998; Kéry *et al.* 2000; Hackney and McGraw 2001; Forsyth 2003; but see Sowig 1989; Van Treuren *et al.* 1993; Aizen and Feinsinger 1994; Costin *et al.* 2001) gives to plants a disadvantage in term of reproduction.

IMPOSSIBILITY OF FINDING THE RIGHT PARTNER: DECREASED POLLINATION SUCCESS IN SEXUALLY POLYMORPHIC POPULATIONS (PRE-ZYGOTIC NON FERTILCROSSES)

Most of plants reproduce sexually using mating systems that avoid self-fertilization. A consequence of such mating system is that individuals are not able to cross with all the conspecific (Nettancourt, 2001). In small populations, such mating systems can potentially exacerbate pollen limitation by reducing the number of compatible crosses among the available fertile partner (Washitani *et al.* 1994; Ramsey and Vaughton 2000)

Three main mating systems in plants result in selfed progeny avoidance. Those mechanisms can be paralleled to the mate choice in some animal mating systems (Bessa-Gomes *et al.* 2003; Møller and Legendre 2001). Nearly 10% of plant species are dioecious (Barrett 2002). In such species, each individual only produces flowers of one of the two sexes (male and female). All other flowering plant species are hermaphroditic and can theoretically perform self and geitonogamous pollinations. However, most of hermaphroditic species perform sexual reproduction using heteromorphic and homomorphic self-incompatibility mating systems (De Nettancourt 2001; Barrett, 2002; Kao & Tsukamoto 2004). Different mating types coexist in the species and individuals sharing the same mating types are not able to cross. In heteromorphic self-incompatible species, each individual displays one morph of the two or three mating types (long-, mid- and short-styled) that prevent selfing and intramorph mating (Barrett 2002). In homomorphic self-incompatible species, a S-locus contains at least two closely linked genes that code for a stigmatic receptor and a pollen determinant. If the

pollen determinants expressed by the haploid S-allele (gametophytic self-incompatibility) or by the diploid anther's S-alleles (sporophytic self-incompatibility) match with one of the stigmatic alleles, pollen tube growth or pollen germination is aborted (Franklin-Tong and Franklin 2003 ; Hiscock and McInnis 2003).

In such species, the reproductive success depends not only of the number of available partners in the population (e.g. Colling, Reckinger and Matthies 2004) but also of the number of compatible (sex, morphs or S-alleles) gametes produced by the population (e.g. Byers and Meagher, 1992; House 1993). Darwin (1877) first observed that distylous species are cross-sterile with half its conspecifics, reducing mate availability of 50%. In small populations of homomorphic species, the number of mating type maintained is expected to be low (Wright 1939; Richman and Kohn 1996; Glémin *et al.* 2001) which increases the proportion of incompatible mate availability that may cause low seed set (Byers and Meagher 1992). In small natural populations of *Aster furcatus* (Asteraceae), a sporophytic self-incompatible plant, Reinartz and Les (1994) found that seed set was limited by a low number of S-alleles. In *Burchardia umbrella*, Ramsey and Vaughton (2000) observed that compatible pollen supplementation compared to open pollination significantly increases percentage seed set and significantly decreases percentage seed abortion. In parallel, they observed that effects of pollen supplementation are more significant when flowering plant density is lower.

Furthermore, such mating systems increases inter-individual distances to find a compatible partner which augment pollen dilution and decrease reproduction success. In *Neolitsea dealbata*, a dioecious rain forest tree species, the number of pollen tube per style decreases when the distance of the nearest male increases. On isolated females, a large proportion of flowers are unpollinated and in results, they produce fewer fruits than gregarious females (House 1993). Several gynodioecious species have also shown that seed set on females decreases with increased distance from the nearest hermaphroditic plant

(Widen and Widen 1990 – *Glechoma hederaceae*; McCauley and Brock 1998 – *Silene vulgaris*; Graff 1999 – *Sidalcea malviflora malviflora*).

Finally, though negative frequency-dependent selection increases the number of mating types maintained in finite population (Vekemans *et al.* 1998), small or isolated population are prone to demographic stochasticity that can skewed mating type frequencies (e.g. Heuch 1980; Les *et al.* 1991; Byers and Meagher 1992; Endels *et al.* 2002; Wang *et al.* 2005). As for animals, mating type frequency fluctuations result in the scarcity of suitable partners (Stephens *et al.* 1999; Bessa Gomes *et al.* 2004). For example, Hilfiker *et al.* (2004) report that small populations of *Taxus baccata*, a dioecious conifer species, exhibit significant sex ratio bias contrary to large ones. In *Primula veris* a distylous species, deviations from 1:1 ratio are much larger in small populations, and six of the smallest populations had lost one morph (Kery, Matthies and Schmid 2003). Biased morph frequencies or the loss of mating types may be one of the reasons for the strongly reduction of reproductive success in small populations (e.g. Wang *et al.* 2005). In *Primula vulgaris*, a distylous self-incompatible perennial herb, Brys *et al.* 2004 found that the proportion of flowers setting fruit and the number of seeds per fruit were significantly lower in individuals of the common morph type when morph frequency was biased. Shibayama and Kadono (2003) observed that in the populations with biased floral morph ratio, the pollen on the stigma of the common morphs were dominated by pollen of the same morph, resulting in reduced seed set (see also Nicholls 1987). So, multiallelic self-incompatible species in small populations experiment genetic bottlenecks that reduce the number of S-alleles and the proportion of compatible matings (Reinartz & Les 1994). Consequently, self-incompatible systems are selectively unfavourable in small populations and can amplify the Allee effect observed. An increasing bias in mating type frequencies negatively affects reproductive success (Carlsson-Graner *et al.* 1998; Kéry *et*

al. 2003 – *Primula veris*; Shibayama and Kadono 2003 – *Nymphoides indica*; Brys *et al.* 2004).

Those three conjoint effects of self-incompatible systems and small population size (decrease number of mating type and so number of partner, increase inter-individual distances to find a mate and bias the frequencies of mating types) can individually or conjointly result in the extinction of one or more mating type.

Up to now, the conjoint impact of small population size and self-incompatibility systems on the evolution of the plant species and their consequences for their conservation success have been mainly studied on dioecious and heteromorphic self-incompatible species. Actually, when the number of mating type increase, the incompatible proportion of the population decrease. So, dioecious and heteromorphic self-incompatible species are considered to be more sensitive to these effects than homomorphic species which bear more than 3 mating types (see for example Wang *et al.* 2005). Moreover, the mating types of those species can be easily determined without further molecular or controlled crosses work. However, the last decade progress in molecular tool is permitting to attribute their homomorphic mating types to individuals. Further studies can now be lead to identify the evolutionary and conservative implications of such mating systems.

REDUCED MATING SUCCESS WHEN MATED WITH UNSUITABLE PARTNERS: DECREASED FERTILIZATION SUCCESS AT LOW DENSITY

In small populations, the kinship and inbreeding coefficient increase through generations. In result, progeny from small populations is expected to endure inbreeding depression. In wind pollinated species at low density airborne, pollen shared have higher chance to come from related individuals. Perry and Knowles (1990) have found high levels of

self-pollination in *Thuja occidentalis* populations, probably due to low-density of trees and therefore a lack of cross-pollination. In animal pollinated plants, reproductive success may also be limited even when fertilization takes place. Indeed, pollinators visit less often low-density or isolated patches, but probe more flowers in such patches, which enhances geitonogamous pollen transfer (Heinrich 1979; de Jong et al. 1993; Klinkhamer and de Jong 1993; Ferdy and Smithson 2002; Ohashi and Yahara 2002). It has been often shown that fitness of individuals produced by inbred crosses is reduced compared to fitness of individuals produced by outbred crosses. Thus, in low-density patches or in small population size, plants receive less pollinator visits (quantity) and geitonogamous self-pollination is increased (quality). Few studies have provided density or population size threshold below which population have difficulty to maintain (Groom 1998).

Self-incompatibility does not protect plants from such decrease in reproductive success. In self-incompatible species, lower population size seems to be correlated with higher offspring mortality rate due to the maintenance of genetic load (Fischer *et al.* 2003). Self-incompatible species are expected to carry high and sheltered genetic load if the locus of the deleterious alleles is linked to the S-locus (Stone 2004). Genetic load can not be purged in this case since heterozygosity is maintained at the S-locus and the linked loci (Glemin *et al.* 2001). As a consequence, in small populations, more frequent related crosses increase the risk to express deleterious alleles. This phenomenon can be observed at different stages of the progeny development. For example, Fischer *et al.* (2003) showed that the offspring survivals during events stepping from the fecundation to the seedling first stages are positively correlated with population size. Finally, the number of plants resulting per ovule 14 months after germination significantly varies according to the population size. This negative effect of related crosses can be directly quantified in late acting self-incompatible species (*e.g.*

Asclepias exaltata) in which self- and inbred progeny is aborted in postzygotic events (Lipow and Wyatt 2000).

“GROUP LIVING” IN PLANTS

There are many routes by which group living may bring about an Allee effect at low densities. Group living often constitute an anti-predator strategy, either by allowing for shared vigilance or by diluting individual risk. Hence, at low density individuals may face higher mortality or be forced to increase vigilance, while loosing feeding or reproductive opportunities.

Group living may equally play an important role in resource monopoly, allowing for the exploitation of resources in the presence of superior competitors. That is the case of African wild dogs, that when hunting in groups can co-exist with superior carnivores such as lions and hyenas, but whose hunting success depends highly on pack size. In this section we argue that many of the mechanisms underlying group living in animals have an equivalent in plants, which has selected for aggregation. We will focus in predation avoidance and joint exploitation of resources.

PREDATOR DILUTION OR SATIATION

Plants in nature are regularly attacked by many different herbivore species. Through time, they have acquired traits that may provide them a protection against those predators. One of those protections may be the safety of numbers. Indeed, although predators tend to concentrate in stands of high densities of resources (Root 1973), preys do not necessarily face a higher predation risk at high density. The predator functional response to prey may result in predator satiation, thus partially releasing the prey population from predation. This is notably the case of species that experience mast seeding production. This phenomenon is the synchronous production of large seed crops by a population of plants some particular years

(Janzen 1971; Silvertown 1980; Kelly 1994). During inter-mast years, number of predators decline due to the absence of food resources. The over-abundance of seeds produced during mast years will exceed the capacity of seed predators to consume them. Thus, the plant population will experience predator satiation if enough seed is produced during mast years, if the interval between mast years is sufficient to result in a decrease in the seed predator population, if the seed production is synchronized between individuals in the same population (Donaldson 1993), and if the plant population has a sufficient size. In that manner, levels of seed predation are reduced. The larger the population, the more the predation is diluted, enhancing the fitness of the population. This phenomenon was mainly described on tree species because individuals that can have irregular or long interval patterns of masting belong to long-lived perennial species. In that way, a negative correlation between seed crop size and percentage predation by insects has been reported on red pine (Mattson 1971), on pedunculate oak *Quercus robur* L. (Crawley and Long 1995) and on hornbeam species *Carpinus sp.* (Shibata *et al.* 1998)). Predator satiation has been also reported on Poacea, firstly on *Chionochloa pallens* (Kelly and Sullivan 1997) and secondly extended at eleven species of *Chionochloa* genus (Kelly *et al.* 2000).

ANTIPREDATOR VIGILANCE OR AGGRESSION

Another way in which aggregation can offer a protection from predators is through anti-predator vigilance and aggression. For some plant species, damages to leaves can provoke the synthesis in plant tissues of a chemical substance that repels pests. This production of biochemical's could have an impact on congener neighbours i.e. it could prompt them to produce the same substance. Evidence of such interplant signal transfer, known as "communication" between plants remains controversial (Bruin *et al.* 1995; Shoule and Bergelson 1995). Agrawal (2000) underlined that "few topics in plant ecology have inspired so much excitement and controversy, however, as communication between plants". Although

previous studies have suffered from methodological problems, recent papers with more rigorous protocol have revived the topic (Dolch and Tschardtke 2000; Karban *et al.* 2000; Arimura *et al.* 2000).

Rhoades (1983) found that trees such as alders or willows that had been damaged by caterpillars or webworms were poor hosts for subsequent predators. More surprisingly, he showed that the neighbors of the damaged trees were poor hosts as well. He suggested that airborne communication between damaged trees and their neighbors had increased the resistance level of the neighbors. Some experiments seem to support that communication could occur between plants (Baldwin and Schultz 1983; Bruin *et al.* 1992). Herbivory by the leaf beetle *Agelestica alni* increased with distance from one attacked tree (*Alnus glutinosa*) suggested signal transfer between trees as reported by Dolch and Tschardtke (2000) and Tschardtke *et al.* (2001).

The evolution of such a defense process seems to base on the ability of the neighbor to perceive defense products elaborated by damaged trees (Bruin *et al.* 1992) and that it provokes them to synthesize the same substance. This process is really effective if individuals are enough in number and density. Isolated plants cannot benefit from this advantage against predators. We can thus assume that predation level is negatively correlated to plant density or at least that there is a threshold in population size and/or density under which the defense of a tree is not perceived by the others.

Another defense process requires a sufficient number of individuals. For certain species, the herbivore attacks are known to increase the emission of volatiles that attract the predators of their herbivores. *Nicotiana attenuata* for example, when attacked by leaf-feeding herbivores, releases volatiles that increase the egg production of a generalist predator (Kessler and Baldwin 2001). Using spider mites (*Tetranychus urticae*) and predator mites (*Phytoseiulus persimilis*), Bruin *et al.* (1992) showed that the attacked plants as well as their

neighbors become more attractive to predatory mites and less susceptible to spider mites. This process is all the more efficient when plants are numerous and densely growing.

COOPERATIVE PREDATION OR RESOURCE DEFENSE

The term allelopathy was first proposed by Molish (1937) to describe inhibitory or stimulatory biochemical interactions that occurred between members of the plant kingdom. IAS (1998) redefined allelopathy to include "... any process involving secondary metabolites produced by plants, microorganisms, viruses and fungi that influence the growth and development of biological systems...". Over many years, various types of allelochemicals have been isolated and characterized from hundreds of plants. Such plants have inhibitory effects on the growth of neighboring plants by releasing allelopathic chemicals into the soil, either as exudates from living tissues or by decomposition of plant residues (e.g. leaves of *Coleus amboinicus* (Kathiresan 2000), *Bunias orientalis* (Dietz and Winterhalter 1996), *Duranta repens* (Hiradate *et al.* 1999); bulbs of *Allium ursinum* (Djurdjevic *et al.* 2004); fruit and seed extracts of *Prosopis juliflora* (Noor *et al.* 1995), peel of *Citrus junos* (Kato-Naguchi 2002); decomposition of *Acacia melanoxylon* (González *et al.* 1995), *Trifolium pretense* (Ohno and Doolan 2001)). Some authors have studied the relationship between phytotoxins and the density of target plants (Weidenhamer *et al.* 1989; Tseng *et al.* 2003). Weidenhamer *et al.* (1989) defined density-dependent phytotoxic effects as the "differences in the magnitude of inhibition observed when plants are grown at different densities in soil containing a toxic substance". In the experiments studying effects of putative inhibitors produced by *Polygonella myriophylla* on bahiagrass (*Paspalum notatum*) and on black walnut (*Juglans nigra*) on tomato (*Lycopersicon esculentum*), phytotoxicity decreased as target plant density increased. In high density patches, we suppose that phytotoxins are diluted among the plants and that each target plant receives a small dose of inhibiting substance. Thus, for plants

growing in the neighborhood of allelopathic plants, there is a minimal threshold under which they can not maintain.

Few studies have concerned the density effect of allelopathic plants on their own growth rate. Ridenour and Callaway (2001) reported a negative correlation between the abundance of the invasive species *Centaurea maculosa*, and the abundance and diversity of the native plant species in the sites invaded by *C. maculosa*. In patches where *Centaurea* abundance was moderate, authors observed a lower abundance and diversity of native plants compared to patches uninvaded. Moreover, high density patches of *Centaurea* were characterized a complete disappearance of the other species.

So, growing at high-density for plants with allelopathic potential increases their probability to reduce or eliminate other species which compete for same resources.

COLLECTIVE MODIFICATION OR AMELIORATION OF THE ENVIRONMENT

When the individuals of a species need to positively alter the abiotic environment to facilitate its own growth, survival, or reproduction (Holt *et al.* 2004), individuals clearly benefit from the presence of conspecifics. If density in conspecifics is too low, facilitation does not occur. This phenomenon has not been commonly described but some examples are showing how growing in high density can modify significantly the environment of certain plants. For instance, Ferson and Burgman (1990) showed that hemlock (*Tsuga heterophylla*) is less able to acidify the soil and to sequester water in upper soil horizons when it grows at low-density. But, for this species, seedlings establish preferentially on acidic substrates. We presume that the growth rate is enhanced in high density populations. Jain and Singh (1998) found that high density plantations of *Terminalia arjuna* improve soil properties and that consequently, height, diameter and biomass increased significantly from lower to higher plant density.

Some plants need a regular burned of their habitat to close their life cycle (Fire-obligate plants). Generally, the fire helps the seeds of certain species to germinate but it also stimulates flowering and seed production, preserves open habitats, and releases mineral elements in the soil. Some of the species such as wiregrass (*Aristida stricta*), thanks to the chemicals they contain, take an active part in the propagation of the fire. Their growth in high density facilitates its spread (Maliakal *et al.* 2000), and thus gives a better chance to the species to survive.

Finally, plants can provide “parental care” to their offspring. This phenomenon has been called “nurse effect”. Seedlings occurring in association with adult structures may experience reduced exposition to drought, ultraviolet radiation, extreme temperatures, salinity or herbivory (Turner *et al.* 1966; Jordan and Nobel 1979; Carlsson and Callaway 1991; Dawson 1993; Hacker and Bertness 1996). Seedlings can also derive nutrient input from captured debris from their parents (Turner *et al.* 1966). Most of studies have concerned interspecific interactions, but nurse effect between conspecifics has received little attention (Boucher *et al.* 1982; Hunter and Aarsen 1988; Bertness and Callaway 1994). Wied and Galen (1998) found that establishment of seedling was enhanced beneath parental cover. Cover by adult debris conserved soil moisture and reduced water loss from seedling tissues. If adults are numerous, the probability for the seedlings to establish increases.

FINAL REMARKS

In conclusion, plants present numerous mechanisms other than pollen limitation that may give rise to a component Allee effect. This observation supports the ubiquity of Allee effects, rendering them an inescapable phenomenon in modern ecology. Its importance is already well established in applied ecology, particularly in conservation biology. The data here presented indicates that Allee effects are likely to be of a prime importance to address

appropriate management plans, for restoration of threatened plant species as well for limitation of the spread of invasive species (Cappuccino 2004). However, despite the clear importance of plant density to plant population dynamics, this component Allee effect has only recently been included in plant management plans, for finding optimal control strategies for the invasive species *Spartina alterniflora* (Davis 2004 a,b).

The incorporation of Allee effects remains to be done in plant population viability analysis. This may contribute to broaden the use of demo-genetics models. Indeed, in addition to their great impact on population viability, Allee effect and genetic factors also strongly interact. Reduced plant fitness in smaller populations due to genetic mechanisms would constitute a genetic Allee effect for some authors (Stephens *et al.* 1999; Fischer *et al.* 2000; Fischer *et al.* 2003; Willi *et al.* 2005). Allee effects increase selfing rate and may cause inbreeding depression (*Gentiana pneumonanthe* - Raijmann *et al.* 1994; Oostermeijer *et al.* 1994; 1998; *Cochlearia bavarica* – Fischer *et al.* 2003; *Ranunculus repens* – Willi *et al.* 2005). For self-incompatible species, genetic drift and Allee effect may interact to lower fecundity and reduced fitness offspring (Willi *et al.* 2005). Low reproductive success and reduced fitness offspring may make small populations more vulnerable to hybridization with wild congeners (Ellstrand and Elam 1993; Levin *et al.* 1996). Consequently, fitness of self-incompatible individuals is highly related to the population size during reproduction events.

This synthesis supports the need for research at the interface between the ecological and evolutionary consequences of Allee effects. Indeed, given that Allee effects reduce individuals' fitness at low density, plants have likely evolved strategies to minimize their impact.

Once again, pollen limitation is likely to show us the way: indeed, plants seem to escape this limitation by combining sexual and asexual reproduction. Many small populations of self-incompatible species partially propagate by an asexual way (*e.g.* Asteraceae: Les *et al.* 1991 ;

Young *et al.* 2002 ; Najadaceae : Hammerli and Reusch 2003 ; Rosaceae : Frascaria *et al.* 1993). They artificially enlarge population, which presents two main advantages. It retains genetic and S-allele diversity, and it increases the interfaces between genotypes, which have the effect to enlarge the number of possible crosses and to rise the probability to produce viable progeny. As a consequence, the production of clones can be interpreted as an adaptive trait to limit Allee effect in reduced size populations.

In conclusion, this synthesis has illustrated the ubiquity of Allee effects in plants. We hope that it may contribute to raise the awareness of plant ecologist for the phenomenon and further its study in plants. We think that this will not only increase our current understanding of plant evolutionary ecology and conservation, but also our general understanding of the Allee effects.

REFERENCES

- Abe, T. (2001) "Flowering phenology, display size, and fruit set in an understory dioecious shrub, *Aucuba japonica* (Cornaceae)." *American Journal of Botany* **88**: 455-461.
- Agrawal, A.A. (2000). "Communication between plants: this time it's real." *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 446.
- Ågren, J. (1996). "Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*." *Ecology* **77**(6): 1779-1790.
- Aizen, M. A. and Feinsinger, P. (1994). "Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry forest, Argentina." *Ecology* **75**(2): 330-351.
- Allee, W. C., Emerson, A. E., Park, O., Park, T. and Schmidt, K. P. (1949). Principals of animal ecology. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Allison, T. D. (1990a). "Pollen production and plant density affect pollination and seed production in *Taxus canadensis*." Ecology **71**(2): 516-522.

Allison, T. D. (1990b). "The influence of deer browsing on the reproductive biology of Canada yew (*Taxus canadensis* Marsh.) II. Pollen limitation: an indirect effect." Oecologia **83**: 530-534.

Amarasekare, P. (1998). "Allee effects in metapopulation dynamics." The American Naturalist **152**(2): 298-302.

Arimura, G.-I., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. And Takabayashi, J. (2002). "Herbivory-induced volatiles elicit defense genes in lima bean leaves." Nature **406**: 512-515.

Ashman, T.-L., and Diefenderfer, C. (2001). "Sex ratio represents a unique context for selection on attractive traits: consequences for the evolution of sexual dimorphism." Am. Nat. **157**: 334-347.

Avilés, L. (1999). "Cooperation and non-linear dynamics: an ecological perspective on the evolution of sociality." Evolutionary Ecology Research **1**: 459-477.

Baldwin, I. T. and Schultz, J. C. (1983). "Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants." Science **221**: 277-279.

Bertness, M.D. and Callaway, R. (1994). "Positive interactions in communities." Trends in ecology and Evolution **9**: 191-193.

Bessa-Gomes, C., Legendre, S. and Clobert J. (2004). "Allee effects, mating systems and the extinction risk in populations with two sexes." Ecology Letters **7**: 802-812.

- Bessa-Gomes, C., Legendre, S., Clobert J. and Møller, A.P (2003). "Modeling mating patterns given mutual mate choice: the importance of individual mating preferences and mating systems." Journal of Biological Systems **11**: 205-219.
- Best, L. S. and Bierzychudek, P. (1982). "Pollinator foraging on foxglove (*Digitalis purpurea*): a test of a new model." Evolution **36**: 70-79.
- Bierzychudek, P. (1987). "Pollinators increase the cost of sex by avoiding female flowers." Ecology **68**(2): 444-447.
- Bosch, M. and Waser, N. M. (1999). "Effects of local density on pollination and reproduction in *Delphinium nuttallianum* and *Aconitum columbianum* (Ranunculaceae)." American Journal of Botany **86**(6): 871-879.
- Boucher, D.H., James, S., and Keeler, K.H. (1982). "The ecology of mutualism." Annual Review of Ecology and Systematics **13**: 315-347.
- Bruin, J., Dicke, M. and Sabelis, M.W. (1992). "Plants are better protected against spider-mites after exposure to volatiles from infested conspecifics." Experientia **48**: 525-529.
- Bruin, J., Sabelis, M.W. and Dicke, M. (1995). "Do plants tap SOS signals from their infested neighbours?" Trends in Ecology and Evolution **10**: 167-170.
- Brys, R., Jacquemyn, H. and Endels, P., Van Rossum, F., Hermy, M., Triest, L., De Bruyn, L. and Blust, G.D.E. (2004). "Reduced reproductive success in small populations of the self-incompatible *Primula vulgaris*." Journal of Ecology **92**: 5-14.
- Byers, D.L. and Meagher, T.R. (1992). "Mate availability in small populations of plant species with homomorphic sporophytic self-incompatibility." Heredity **68**: 353-359.
- Cappuccino, N. (2004). "Allee effect in an invasive alien plant, pale swallow-wort *Vincetoxicum rossicum* (Asclepiadaceae)." Oikos **106**(1): 3-8.

- Carlsson, B.A. and Callaghan, T.V. (1991). "Positive plant interactions in tundra vegetation and the importance of shelter." Journal of Ecology **79**: 973-983.
- Carlsson-Gråner, U., Elmqvist, T., Ågren, J., Gardfjell, H. and Ingvarsson, P. (1998). "Floral sex ratios, disease and seed set in dioecious *Silene dioica*." Journal of Ecology **86**: 79-91.
- Charnov, E. L. (1976). "Optimal foraging, the marginal value theorem." Theoretical Population Biology **9**: 129-136.
- Costin, B. J., Morgan, J. W. and Young, A.G. (2001). "Reproductive success does not decline in fragmented populations of *Leucochrysum albicans* subsp. *albicans* var. *tricolor* (Asteraceae)." Biological Conservation **98**: 273-284.
- Courchamp, F., Clutton-Brock, T. and Grenfell, B. (1999). "Inverse density dependence and the Allee effect." Trends in Ecology and Evolution **14**(10): 405-410.
- Cowie, R. J. (1977). "Optimal foraging in great tits (*Parus major*)." Nature **268**: 137-139.
- Crawley, M. J. and Long, C. R. (1995). "Alternate bearing, predator satiation and seedling recruitment in *Quercus robur* L." J. Ecol. **83**: 683-696.
- Davis, H.G., Taylor, C.M., Lambrinos, J.G. and Strong, D.R. (2004a). "Pollen limitation in a wind-pollinated invasive grass." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**: 13804-13807.
- Davis, H.G., Taylor, C.M., Cihlar, J.C. and Strong D.R. (2004b).). "An Allee effect at the front of a plant invasion: *Spartina* in a Pacific estuary." Journal of Ecology **92**: 321-327.
- Dawson, T.E. (1993). "Hydraulic lift and water use by plants: implications for water balance, performance, and plant-plant interactions." Oecologia **95**: 565-574.
- de Jong, T. J., Waser, N. M. and Klinkhamer, P.G.L. (1993). "Geitonogamy: the neglected side of selfing." Trends in Ecology and Evolution **8**(9): 321-325.

- De Nettancourt, D. (2001). "Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants." 2nd edn. Springer, Berlin.
- Dennis, B. (1989). "Allee effects: population growth, critical density, and the chance of extinction." Nat. Res. Model. **3**: 481-538.
- De Roos, A.M., Persson L. and Thieme H.R. (2003).). "Emergent Allee effects in top predators feeding on structured prey populations." Proc. R. Soc. Lond. B. **270**: 611-618.
- Dietz, H. and Winterhalter, P. (1996). "Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves." Phytochemistry **42**: 1005-1010.
- Djurdjevic, L., Dinic, A., Pavlovic, P., Mitrovic, M., Karadzic, B. and Tesevic, V. (2004). "Allelopathic potential of *Allium ursinum* L." Biochemical Systematics and Ecology **32**: 533-544.
- Dolch, R. and Tschardtke, T. (2000). "Defoliation of alders (*Alnus glutinosa*) affects herbivory by leaf beetles on undamaged neighbours." Oecologia **125**: 504-511.
- Donaldson, J. S. (1993). "Mast-seeding in the cycad genus *Encephalartos* - a test of the predator satiation hypothesis." Oecologia **94**: 262-271.
- Ellstrand, N.C. and Elam, D.R. (1993). "Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation." Annual Review of ecology and Systematics **24**: 217-242.
- Elmqvist, T., Ericson, L., Dannell, K. and Salomonson, A. (1988). "Latitudinal sex ratio variation in willows, *Salix* spp., and gradients in vole herbivory." Oikos **51**: 259-266.
- Endels, P., Jacquemyn, H., Brys, R. and Hermy, M. (2002). "Changes in pin-thrum ratios in populations of the heterostyled *Primula vulgaris* Huds. Does imbalance affect population persistence?" Flora **197**: 326-331.

Feinsinger, P., Murray, K. G., Kinsman, S. and Busby, W.H. (1986). "Floral neighborhood and pollination success in four hummingbird-pollinated cloud forest plant species." Ecology **67**(2): 449-464.

Feinsinger, P., Thiebout III, H. M. and Young, B.E. (1991). "Do tropical bird-pollinated plants exhibit density-dependent interactions ? Field experiments." Ecology **72**(6): 1953-1963.

Ferdy, J. B. and Smithson, A. (2002). "Geitonogamy in rewarding and unrewarding in inflorescences: modelling pollen transfer on actual foraging sequences." Evolutionary Ecology Research **16**: 155-175.

Ferson, S. and Burgman, M.A. (1990). "The dangers of being few: demographic risk analysis for rare species extinction." *in* Mitchell, R.S., Sheviak, C.J. and Leopold, D.J., eds. Ecosystem management: rare species and significant habitats. New York State Museum Bulletin no. 471. Pages 129–132.

Fischer, M., Van Kleunen, M. and Schmid, B. (2000). "Genetic Allee effects on performance, plasticity and developmental stability in a clonal plant." Ecology Letters **3**: 530-539.

Fischer, M., Hock, M. and Paschke, M. (2003). "Low genetic variation reduces cross-compatibility and offspring fitness in populations of a narrow endemic plant with a self-incompatibility system." Conservation Genetics **4**: 325-336.

Forsyth, S. A. (2003). "Density-dependent seed set in the Haleakala silversword: evidence for an Allee effect." Oecologia **136**: 551-557.

Fowler, M. S. and Ruxton, G. D. (2002). "Population dynamic consequences of Allee effects." Journal of Theoretical Biology **215**: 39-46.

- Franklin-Tong, N. and Franklin, F.C.H. (2003). "Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms." Trends in Plant Science **8**: 598-605.
- Frascaria, N., Santi, F. and Gouyon, P.H. (1993). "Genetic differentiation within and among populations of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and wild cherry (*Prunus avium* L)." Heredity **70**: 634-641.
- Freckleton, R.P. (2000). "Biological control as a learning process." Trends in Ecology and Evolution **15**: 263-264.
- Glemin, S., Bataillon, T., Ronfort, J., Mignot, A. and Olivieri, I. (2001). "Inbreeding depression in small populations of self-incompatible plants." Genetics **159**: 1217-1229.
- González, L., Souto, X.C. and Reigosa, M.J. (1995). "Allelopathic effects of *Acacia melanoxylon* R.Br. phyllodes during their decomposition." Forest Ecology and Management **77**: 53-63.
- Graff, A. (1999). "Population sex structure and reproductive fitness in gynodioecious *Sidalcea malviflora malviflora* (Malvaceae)." Evolution **53**: 1714-1722.
- Groom, M. J. (1998). "Allee effects limit population viability of an annual plant." The American Naturalist **151**(8): 487-496.
- Hacker, S.D. and Bertness, M.D. (1996). "Trophic consequences of a positive plant interaction." The American Naturalist **148**: 559-575.
- Hackney, E. E. and McGraw, J. B. (2001). "Experimental demonstration of an Allee effect in American Ginseng." Conservation Biology **15**(1): 129-136.
- Hammerli, A. and Reusch, T.B.H. (2003). "Flexible mating: cross-pollination affects sex-expression in a marine clonal plant." Journal of Evolutionary Biology **16**: 1096-1105.

- Heinrich, B. (1979). "Resource heterogeneity and patterns of movement in foraging bumblebees." Oecologia **40**: 235-245.
- Heuch, I. (1980). "Loss of incompatibility types in finite populations of the heterostylous plant *Lythrum salicaria*." Hereditas **92**: 53-57.
- Hiscock, S.J. and McInnis, S.M. (2003). "Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond." Trends in Plant Science **8**: 606-613.
- Hodges, C. M. (1985). "Reproductive variability and pollen limitation in three *Betula* taxa in northern Sweden." Ecography **17**: 73-81.
- Holm, S. (1994). "Bumble bee foraging: energetic consequences of using a threshold departure rule." Ecology **66**(1): 188-197.
- Holt, R.D., Knight, T.M. and Barfield, M. (2004). "Allee effects, immigration, and the evolution of species niches." The American Naturalist **163**: 253-262.
- House, S.M. (1992). "Population density and fruit set in three dioecious tree species in Australian rain forest." Journal of Ecology **80**: 57-69.
- House, S.M. (1993). "Population success in a population of dioecious forest trees." Oecologia **96**: 555-561.
- Hunter, A.F. and Aarssen, L.W. (1988). "Plants helping plants." Bioscience **38**: 34-39.
- IAS (International Allelopathy Society) (1998). Second Newsletter, Volume 2, Issue 1.
- Jain, R.K. and Singh, B. (1998). "Biomass production and soil amelioration in a high density *Terminalia arjuna* plantation on sodic soils." Biomass and Bioenergy **15**: 187-192.
- Janzen, D.H. (1971). "Seed predation by animals." Annual Review of Ecology and Systematics **2**: 465-492.

- Jennersten, O. and Nilsson, S. G. (1993). "Insect flower visitation frequency and seed production in relation to patch size of *Viscaria vulgaris* (Caryophyllaceae)." Oikos **68**(2): 283-292.
- Jordan, P.W. and Nobel, P.S. (1979). "Infrequent establishment of seedlings of *Agave desertii* (Agavaceae) in the northwestern Sonoran Desert." American Journal of Botany **66**: 1079-1084.
- Kao, T.H. and Tsukamoto, T. (2004). "The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility." Plant Cell **16**: S72-S83.
- Karban, R., I. T. Baldwin, K. J. Baxter, G. Laue, and G. W. Felton. (2000). "Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush." Oecologia **125**: 66-71.
- Kathiresan, R.M. (2000). "Allelopathic potential of native plants against water hyacinth." Crop Protection **19**: 705-708.
- Kato-Naguchi, H., Tanaka, Y., Murakami, T., Yamamura, S. And Fujihara, S. (2002). "Isolation and identification of an allelopathic substance from peel of *Citrus junos*." Phytochemistry **61**: 849-853.
- Kay, Q.O.N., Lack, A.J., Bamber, F.C. and Davies, C.R. (1984). "Differences between sexes in floral morphology, nectar production, and insect visits in a dioecious species, *Silene dioica*." New Phytologist **98**: 515-529.
- Kelly, D. (1994). "The evolutionary ecology of mast seeding". Trends in Ecology and Evolution **9**: 465-470.
- Kelly, D. and Sullivan, J.J. (1997). "Quantifying the benefits of mast seeding on predator satiation and wind pollination in *Chionochloa pallens* (Poaceae)." Oikos **78**: 143-150.

- Kelly, D., Harrison, A.L., Lee, W.G., Payton, I.J., Wilson, P.R. and Schaubert E.M. (2000). "Predator satiation and extreme mast seeding in 11 species of *Chionochloa* (Poaceae)." Oikos **90**: 477-488.
- Kéry, M., Matthies, D. and Spillmann, H-H. (2000). "Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*." Journal of Ecology **88**: 17-30.
- Kéry, M., Matthies, D. and Schmid, B. (2003). "Demographic stochasticity in population fragments of the declining distylous perennial *Primula veris* (Primulaceae)." Basic and Applied Ecology **4**: 197-206.
- Kessler, A. and Baldwin, I. T. (2001). "Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature." Science **291**(5511): 2141-2144.
- Klinkhamer, P. G. L. and de Jong, T. J. (1990). "Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (Boraginaceae)." Oikos **57**(3): 399-405.
- Klinkhamer, P. G. L. and de Jong, T. J. (1993). "Attractiveness to pollinators: a plant's dilemma." Oikos **66**(1): 180-184.
- Klinkhamer, P. G. L., de Jong, T. J. and de Bruyn, G-J. (1989). "Plant size and pollinator visitation in *Cynoglossum officinale*." Oikos **54**: 201-204.
- Knapp, E.E., Goedde, M.A. and Rice, K.J. (2001). "Pollen-limited reproduction in blue oak: implications for wind pollination in fragmented populations." Oecologia **128**: 48-55.
- Koenig, W. D. and Ashley, M. V. (2003). "Is pollen limited? The answer is blowin' in the wind." Trends in Ecology and Evolution **18**:157-159.

Krebs, J.R. (1978). "Optimal foraging: Decision rules for predators. " in J. R. Krebs & N. B. Davis (eds), *Behavioral Ecology: An Evolutionary Approach*, Blackwell Scientific Publications, London, pp. 23-63.

Kunin, W. E. (1992). "Density and reproductive success in wild populations of *Diplotaxis erucoides* (Brassicaceae)." Oecologia **91**: 129-133.

Kunin, W. E. (1993). "Sex and the single mustard: population density and pollinator behavior effects on seed-set." Ecology **74**(7): 2145-2160.

Kunin, W. E. (1997). "Population size and density effects in pollination: pollination foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*." Journal of Ecology **85**: 225-234.

Kuussaari, M., Saccheri, I., Camara, M. and Hanski, I. (1998). "Allee effect and population dynamics in the Glanville fritillary butterfly." Oikos **82**(2): 384-392.

Lamont, B. B., Klinkhamer P. G. L. and Witkowski, E.T.F. (1993). "Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Banksia goodii* - a demonstration of the Allee effect." Oecologia **94**: 446-450.

Le Corff, J., Ågren, J. and Schemske, D.W. (1998). "Floral display, pollinator discrimination and female reproductive success in two monoecious *Begonia* species." Ecology **79**: 1610-1619.

Les, D.H., Reinartz, J.A. and Esselman, E.J. (1991). "Genetic consequences of rarity in *Aster furcatus* (Asteraceae), a threatened, self-incompatible plant." Evolution **45**: 1641-1650.

Levin, D.A., Francisco-Ortega, J. and Jansen, R.K. (1996). "Hybridization and the extinction of rare plant species." Conservation Biology **10**: 10-16.

- Liebhold, A. and Bascompte, J. (2003). "The Allee effect, stochastic dynamics and the eradication of alien species." Ecology Letters **6**: 133-140.
- Lipow, S.R. and Wyatt, R. (2000). "Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L." Genetics **154**: 893-907.
- Mack, A.L. (1997). "Spatial distribution, fruit production and seed removal of a rare dioecious canopy tree species (*Aglaia* aff. *flavida* merr. et Perr.) in Papua New Guinea." Journal of Tropical Ecology **13**: 305-316.
- Maliakal, S.K., Menges, E.S. and Denslow, J.S. (2000). "Community composition and regeneration of Lake Ridge wiregrass flatwoods in relation to time since fire." Journal of the Torrey Botanical Society **127**: 125-138.
- Martinez-Pallé, E. and Aronne, G. (2000). "Pollination failure in mediterranean *Ruscus aculatus* L." Botanical Journal of the Linnean Society **134**: 443-452.
- Mattson, W. J. (1971). "Relationship between cone crop size and cone damage by insects in red pine seed-production areas." Canadian Entomol **103**: 617-621.
- McCauley, D.E. and Brock, M.T. (1998). "Frequency-dependent fitness in *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant." Evolution **52**: 30-36.
- Molish, H. (1937). "Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie." Gustav. Fischer, Verlag, Jena.
- Møller, A.P. and Legendre, S. (2001). "Allee effect, sexual selection and demographic stochasticity." Oikos **92**: 27-34.
- Morris, D.W. (2002).). "Measuring the Allee effect: positive density dependence in small mammals." Ecology **83**: 14-20.

- Nicholls, M. S. (1987). "Pollen flow, self-pollination and gender specialization: factors affecting seed set in the tristylous species *Lythrum salicaria* (Lythraceae)." Plant Systematics and Evolution **156**: 151-157.
- Nilsson, S. G. and Wastljung, U. (1987). "Seed predation and cross-pollination in mast-seeding beech (*Fagus sylvatica*) patches." Ecology **68**: 260-265.
- Noor, M., Salam, U. and Khan, M.A. (1995). "Allelopathic effects of *Prosopis juliflora* Swartz." Journal of Arid Environments **31**: 83-90.
- Ohashi, K. and Yahara, T. (2002). "Visit larger displays but probe proportionally fewer flowers: counterintuitive behaviour of nectar-collecting bumble bees achieves an ideal free distribution." Functional Ecology **16**: 492-503.
- Ohno, T. and Doolan, K.L. (2001). "Effects of red clover decomposition on phytotoxicity to wild mustard seedling growth." Applied Soil Ecology **16**: 187-192.
- Oostermeijer, J.G.B., Van Eijck, M.W. and Den Nijs, J.C.M. (1994). "Offspring fitness in relation to population size and genetic variation in the rare perennial plant species *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae)." Oecologia **97**: 289-296.
- Oostermeijer, J.G.B., Luijten, S.H., Krenová, Z.V. and Den Nijs, J.C.M. (1998). "Relationships between population and habitat characteristics and reproduction of the rare *Gentiana pneumonanthe* L." Conservation Biology **12**: 1042-1053.
- Perry, D.J. and Knowles, P. (1990). "Evidence of high self-fertilization in natural populations of eastern white cedar (*Thuja occidentalis*)." Can. J. Bot. **68**: 663-668.
- Petrovskii, S.V, Morzov, A.Yu and Venturino, E. (2002). "Allee effect makes possible patchy invasion in a predator-prey system" Ecology Letters **5**: 345-352.

- Pleasants, J. M. (1989). "Optimal foraging by nectarivores: a test of the marginal-value theorem." American Naturalist **134**: 51-71.
- Pyke, G. H. (1978a). "Optimal foraging: movements patterns of bumblebees between inflorescences." Theoretical Population Biology **13**: 72-98.
- Pyke, G. H. (1978b). "Optimal foraging in humming birds: testing the marginal value theorem." American Zoologist **18**: 627-640.
- Pyke, G. H. (1979). "Optimal foraging in bumblebees: rule of movement between flowers within inflorescences." Anim. Behav. **27**: 1167-1181.
- Pyke, G. H. (1980). "Optimal foraging in bumblebees. Calculation of net rate of energy intake and optimal patch choice." Theoretical Population Biology **17**: 232-246.
- Pyke, G. H. (1982). "Foraging in bumblebees: rule of departure from an inflorescence." Canadian Journal of Zoology **60**: 417-428.
- Pyke, G. H. (1984). "Optimal foraging theory: a critical review." Ann. Rev. Ecol. Syst. **15**: 523-575.
- Pyke, G. H., Pulliam H.R. and Charnov E.L. (1977). "Optimal foraging: a selective review of theory and tests." Quat. Rev. Biol. **52**: 137-153.
- Raijmann, L.E.L., Van Leeuwen, N.C., Kersten, R., Oostermeijer, J.G.B., Den Nijs, J.C.M. and Menken, S.B.J. (1994). "Genetic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L." Conservation Biology **8**: 1014-1026.
- Ramsey, M. and Vaughton, G. (2000) "Pollen quality limits seed set in *Burchardia umbellata* (Colchicaceae)." American Journal of Botany **87**: 845-852.

Regal, P. (1982). "Pollination by wind and animals: ecology of geographic patterns." Annual Review of Ecology and Systematics **13**: 497–524.

Reinartz, J.A. and Les, D.H. (1994) "Bottleneck-induced dissolution of self-incompatibility and breeding system consequences in *Aster furcatus* (Asteraceae)." American Journal of Botany **81**: 446-455.

Rhoades, D. F. (1983). "Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: evidence for pheromonal sensitivity of willows." Plant resistance to insects. P. A. Hedin. Washington DC: 55-68.

Richman, A.D. and Kohn, J.R. (1996). "Learning from rejection: the evolutionary biology of single-locus incompatibility." Trends in Ecology & Evolution **11**: 497-502.

Ridenour, W.M. and Callaway, R.M. (2001). "The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass." Oecologia **126**: 444-450.

Root, R.B. (1973). "Organization of a plant-arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of Collards (*Brassica oleracea*)." Ecological monographs **43**: 95-124.

Schaal, B. A. (1978). "Density dependent foraging on *Liatris pycnostachya*." Evolution **32**: 452-454.

Schmitt, J. (1983). "Flowering plant density and pollinator visitation in *Senecio*." Oecologia **60**: 97-102.

Shibata, M., Tanaka, H. and Nakashizuka, T. (1998). "Causes and consequences of mast seed production on four co-occurring *carpinus* species in Japan." Ecology **79**: 54-64.

Shibayama, Y. and Kadono, Y. (2003). "Floral morph composition and pollen limitation in the seed set of *Nymphoides indica* populations." Ecological Research **18**: 725-737.

Shoule, I. and Bergelson, J. (1995). "Interplant communication revisited." Ecology **76**: 2660-2663.

Shykoff, J. A. and Bucheli, E. (1995). "Pollinator visitation patterns, floral rewards and the probability of transmission of *Microbotryum violaceum*, a venereal disease of plants." Journal of Ecology **83**: 189–198.

Sih, A. and Baltus, M.-S. (1987). "Patch size, pollinator behavior, and pollinator limitation in catnip." Ecology **68**(6): 1679-1690.

Silander, J. A. J. (1978). "Density-dependent control of reproductive success in *Cassia biflora*." Biotropica **10**: 292-296.

Silvertown, J. W. (1980). "The evolutionary ecology of mast seeding in trees." Biological journal of the Linnaean Society **14**: 235-250.

Smith, C. C., Hamrick, J.L. and Kramer, C.L. (1988). "The effects of stand density on frequency of filled seeds and fecundity in lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl.)." Can. J. For. Res. **18**: 453-460.

Sork, V.L., Davis, F.W., Smouse, P.E., Apsit, V.J., Dyer, R.J., Fernandez, J.F. and Kuhn, B. (2002). "Pollen movement in declining populations of Californian Valley Oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone?" Molecular Ecology **11**: 1657-1668.

Sowig, P. (1989). "Effects of flowering plant's patch size on species composition of pollinator communities, foraging strategies, and resource partitioning in bumblebees (Hymenoptera: Apidae)." Oecologia **78**: 550-558.

Stephens, P.A. and Sutherland, W.J. (1999). "Consequences of the Allee effect for behaviour, ecology and conservation." Trends in Ecology and Evolution **14**(10): 401-405.

Stephens, P.A., Sutherland, W.J. and Freckleton, R.P. (1999). "What is the Allee effect?" Oikos **87**: 185-190.

Stone, J.L. (2004). "Sheltered load associated with S-alleles in *Solanum carolinense*." Heredity **92**: 335-342.

Thomson, J. D. (1981). "Spatial and temporal components of resource assessment by flower-feeding insects." J. Anim. Ecol. **50**: 49-60.

Thompson, J.D., Barrett, S.C.H. and Baker, A.M. (2003). "Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism." Proceedings of the Royal Society ser. B. **270**: 949-953.

Tscharntke, T., Thiessen, S., Dolch, R. and Boland, W. (2001). "Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*." Biochemical Systematics and Ecology **29**: 1025-1047.

Tseng, M.H., Kuo, Y.H., Chen, Y.M. and Chou, C.H. (2003). "Allelopathic potential of *Macaranga tanarius* (L.) muell.-arg." Journal of Chemical Ecology **29**(5): 1269-1286.

Turner, R.M., Alcorn, S.M., Olin, G. and Booth, J.A. (1966). "The influence of shade, soil and water on saguaro seedling establishment." Botanical Gazette **127**: 95-102.

Van Treuren, R., Bijlsma, R., Ouborg, N.J. and Van Delden, W. (1993). "The effects of population size and plant density on outcrossing rates in locally endangered *Salvia pratensis*." Evolution **47**(4): 1094-1104.

Waites, A.R. and Ågren, J. (2004). "Pollinator visitation, stigmatic pollen loads, and among population variation in seed set in *Lythrum salicaria*." Journal of Ecology **92**: 512-527.

Washitani, I., Osawa, R., Namai, H. and Niwa M. (1994). "Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation." Journal of Ecology **82**: 571–579.

Watanabe, A., Goka, K. and Washitani, I. (2003). "Effects of population spatial structure on the quantity and quality of seeds set by *Primula sieboldii* (Primulaceae)." Plant Species Biology **18**: 107-121.

Weidenhamer, J., Hartnett, D. and Romeo, J. (1989). "Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants." Journal of Applied Ecology **26**(2): 613-624.

Whitehead, D. R. (1983). "Wind pollination: some ecological and evolutionary perspectives." In L. Real [ed.], Pollination biology, 97–108. Academic Press, Orlando, Florida, USA.

Widén, B. (1993). "Demographic and genetic effects on reproduction as related to population size in a rare, perennial herb, *Senecio integrifolius* (Asteraceae)." Biological Journal of the Linnean Society **50**: 179-195.

Widen, B. and Widen, M. (1990). "Pollen limitation and distance dependent fecundity in females of the clonal gynodioecious herb *Glechoma hederacea* (Lamiaceae)." Oecologia **83**: 191-196.

Wied, A. and Galen, C. (1998). "Plant parental care: conspecific nurse effects in *Frasera speciosa* and *Cirsium scopulorum*." Ecology **79**: 1657-1668.

Wilcock, C. and Neiland, R. (2002). "Pollination failure in plants: why it happens and when it matters." Trends in Plant Science **7**(6): 270-277.

Willi, Y., Van Buskirk, J. and Fischer, M. (2005). "A threefold genetic Allee effect: population size affects cross-compatibility, inbreeding depression, and drift load in the self-incompatible *Ranunculus repens*." Genetics **xx**: xx-xx.

Young, A.G., Hill, J.H., Murray, B.G. and Peakall, R. (2002). "Breeding system, genetic diversity and clonal structure in the sub-alpine forb *Rutidosia leiolepis* F. Muell. (Asteraceae)." Biological Conservation **106**: 71-78.

Zimmerman, M. (1981). "Optimal foraging, plant density and the marginal value theorem." Oecologia **49**: 148-153.

Annexe 3

Genetical and ecological factors influencing female fitness in a self-incompatible and partially clonal forest tree species, *Prunus avium* L.

Solenn Stoeckel & Stéphanie Mariette

Manuscrit en préparation

Introduction

Many plants reproduce sexually thanks to mating systems avoiding the selfed progeny (De Nettancourt 2001; Barrett 2002). Self-incompatibility systems, either gametohytic or sporophytic, are one of the mechanisms preventing self-fertilization. Many plants are able to propagate asexually (Honday & Bossuyt 2005). Nevertheless, species that combine sexual reproduction controlled by self-incompatibility systems and partially asexual propagation may appear to be evolutionary paradoxes.

On one hand, asexual propagation and spatial aggregation of conspecifics may enhance the female reproductive success as predicted by the Allee effects theory (Allee 1949; Ghazoul 2005; LeCadre *et al.* submitted). Genotypes performing asexual propagation are maintained through several sexual generations and, consequently, can participate to more reproductive events than exclusive sexual propagating genotypes (DesRochers & Lieffers 2001). Besides, partially asexual genotypes increase the number of gametes generated per reproductive events. Finally, during sexual events, the reproductive success of animal pollinated species is largely determined by the number and the foraging behavior of pollinators. Both foraging theory and observations show that isolated patches or local small density of flowering plants provide less rewards, are less attractive and consequently less visited by pollinators than gregarious or higher density patches (e.g. Pyke 1980; Thomson 1981; Klinkhamer & De Jong 1993; Agren 1996; Steffan-Dewenter & Tschardtke 1999; Ward & Johnson 2005). On the other hand, asexual propagation may exacerbate pollen limitation both in quantity and in quality (Aigner 2004). First, high local density of conspecifics may exacerbate within-patch competition particularly for pollinators' recruitment and so decrease flower to fruit ratio transformation (Tarasjev 2005).

In the case of the combination of partial asexuality and self-incompatibility, high population structure may locally skew the S-allele frequencies. In this case, individuals should display

high variance in reproductive success depending on the frequencies of the mating types they bear (see Byers & Meagher 1992). Besides, localized high rewards availability can reduce pollen exportation by settle down the pollinators (Harder & Barrett 1995). Finally, individuals from the same genet may act like filters and locally dilute the pollen availability with geitonogamous pollen (De Jong *et al.* 1993; Ushimaru & Kikuzawa 1999). Then in the case of self-incompatible species, asexual reproduction is thus expected to negatively affect the sexual reproduction by reducing the quantity of compatible pollen brought in the stigmas (Aspinwall & Christian 1992). Few studies report on the impact of both reproduction traits on individuals' reproductive success within a population.

In most European forest, wild cherry (*Prunus avium* L.) populations present a scattered and patchy spatial structure (Ducci & Santi 1997). This species combines asexual propagation using suckering roots and sexual reproduction characterized by a gametophytic self-incompatible system. Each year, at the end of the winter, the wild cherry trees produce a high number of entomophilous and hermaphroditic white flowers which supply most of Apoidea species in pollen and nectar (see Pesson & Louveaux 1984 and references therein). Recent molecular advances in the *Prunus* identification of S-alleles have permitted to accurately identify the individual types (Sonneveld *et al* 2003; in press), and make the exploration of the conjoint impact of the self-incompatibility system and partially asexual propagation on individual reproductive success possible.

In the present work, we investigate the combined influence of asexuality through suckering and self-incompatibility system on female component of reproductive success in a population of wild cherry.

Concerning the female reproductive success, we tested whether asexuality contributes to decrease or not fructification. We tested whether the genetic compatibility of the surrounding

trees increased fructification. We tested whether aggregation favours fructification. Finally, since phenotypic characteristics of trees can also influence reproductive success (Oddou-Muratorio et al. 2005), we also tested the effects of the diameter and the height of trees on fructification.

Material and Methods

1. Studied site

The St. Gobain surveyed site covers 22 ha within a wide broad-leaved forest (total area: 6 000 ha). 247 flowering trees were localized and genotyped.

1.1. Trees mapping

To access spatial effect, we calculated pairwise distances between all the 247 trees found. We collected the latitude and the longitude position for each tree using a Global Positioning System (Trimble[®] Pro XR). To enhance the precision of the positioning triangulations by reducing the noises and the bias errors inherent to GPS localization, we used both a roving station and a known position reference receiver (ENGREF base station, Nancy) to apply real-time and post-processing differential techniques. Post processing corrections were performed using the software Pathfinder Office v2.51[®]. We computed the positioning errors for each tree as the standard deviation of the distance separating ten consecutive measures of the tree position. The tree positions were admitted as the mean position of the ten positioning record. The population map was obtained computing GPS corrected positions with the Diva-Gis software v5.2.

1.2. Trees genotyping

We genotyped all trees found in the population using a combination of eight microsatellites. Compatibility groups were categorized using three pairs of consensus primers amplifying loci in the *Prunus* S-RNase gene (Sonneveld *et al.* 2003; Sonneveld *et al.* in press). Clonal patches were identified. Using Waits *et al.* (2001) method, we estimated the probability that individuals sharing the same genotype were not clones. We found that identified clone patches have less than 1.2×10^{-3} chance to result from sexual reproduction. For details on the molecular characterization of the population and clone identification, see Stoeckel *et al.* (in press).

2. Analysis of female fitness

2.1. Fructification measures

To test the hypotheses concerning the individual seed-set, we chose to analyse the flower transformation into fruits and seeds of twenty-one wild cherry trees randomly selected in the St. Gobain population. Using Accrobranche[®] techniques, we climbed up each tree in which we chose a branch oriented towards the exterior of the crown. All the flowers of the branch were counted in april 2004. Then, on the same branch, fruits were counted in june 2004.

2.2. Data analysis

Distance between trees

From the latitude and the longitude positions, we calculated all pairwise distances between trees following:

$$D_{(AB)} = R_e \times \text{Arc cos}(\sin(\text{lat}A) \times \sin(\text{lat}B) + \cos(\text{lat}A) \times \cos(\text{lat}B) \times \cos(\text{lon}B - \text{lon}A))$$

Where A is the first position, B the second, $\text{lat}X$ is the latitude position of X in radian, $\text{lon}X$ is the longitude position of X expressed in radian and R_e is the local Earth's radius value.

Data transformation

For each studied tree, we calculated the proportion of flowers successfully pollinated into a fruit bearing a seed. The Anderson-Darling goodness-of-fit procedure implemented in Minitab v14.1 (Minitab Inc.©) were used to test whether our data set followed a Gaussian distribution or not. As the distributions biased from a Gaussian one, we explored the arcsinus, square-root and arcsinus of square-root transformations. Furtherall, all predictor variables were

normalised $x_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma}$ where \bar{x} is the mean and σ the standard deviation values of the

predictor per neighbourhood size.

Regression analysis

As the neighbourhood size of each tree is not known, we made a regression analysis with a neighbourhood size increasing from the nearest tree to the total size of the population minus one.

For each neighbourhood size, the following model was tested:

$$\left(\frac{Fr}{F}\right) = mDist(x) + \text{var } Dist(x) + nC(x) + nCA(x) + mDistCA(x) + \text{var } DistCA(x) + nH(x) + mDistH(x) + \text{var } DistH(x) + nD(x) + mDistD(x) + \text{var } DistD(x)$$

where $\left(\frac{Fr}{F}\right)$ is the flower to fruit ratio of the studied tree, $mDist(x)$ is the mean distance between the studied tree and its (x) nearest neighbours, $\text{var } Dist(x)$ is the variance of the distance of the (x) nearest neighbours, $nC(x)$ is the number of ramets among the (x) nearest neighbours, $nCA(x)$ is the number of compatible S-alleles among the (x) nearest neighbours, $mDistCA(x)$ is the mean distance separating the studied tree from its $nCA(x)$, $\text{var } DistCA(x)$ is the variance of the distance separating the studied tree from its $nCA(x)$, $nH(x)$ is the number of higher individuals among the (x) nearest neighbours, $mDistH(x)$ is the mean distance from the $nH(x)$, $\text{var } DistH(x)$ is the variance of the distance from the $nH(x)$, $nD(x)$ is the number of individuals of bigger diameter among the (x) nearest neighbours, $mDistD(x)$ is the mean distance of the $nD(x)$ and $\text{var } DistD(x)$ is the variance of the distance of the $nD(x)$.

Each neighbourhood size multiple regression analysis was performed using the GLM procedure implemented in SAS v8 (SAS Institute Inc.).

Relationships among parameters

The independence and the relationship among the studied and transformed parameters were explored using the Pearson product-moment correlation test implemented in Minitab v14.1.

Results

Trees positioning

The positioning errors were respectively as 0.857 ± 0.3 (s.d.) and 1.280 ± 0.4 (s.d.) meters for latitude and longitude. Spatial pattern of wild cherry revealed a high variability in inter-individual distances and aggregation. Some trees can be considered as isolated (more than 101 meters from the nearest conspecific) while most of them are grouped in patches (Figure 1).

Fructification values

All trees found in the population exhibited mass flowering for two to four weeks. The 21 selected trees displayed 1180 (s.d.=435) flowers per studied branch but only 39 (s.d.= 59) fruits bearing seed were found two months later. The proportion of flowers successfully pollinated into a fruit varied among trees from 0 fruit per 100 flowers produced to 14 fruits per 100 flowers.

Normality and transformation

The proportion of flowers successfully fertilized into fruit and seed did not fit a Gaussian distribution ($A^2=2.210$, $P<0.005$). Consequently, the fructification response was transformed using its root-square since it displayed the lowest A^2 criterion so that the distribution cannot be distinguished from a normal one ($A^2=0.572$, $P=0.121$).

General model results

The capacity of the model and its predictor variables to explain the fructification observed on wild cherry trees varied with the neighbourhood size considered. The general model was significant only for 13 neighbourhood sizes on 247.

In details, most of the parameters showed regular tendencies to predict the proportion of flowers successfully pollinated into fruits and were significant for several neighbourhood sizes (Table 2).

Considering the parameter for testing asexuality ($nC(x)$), all the significant results and more than 97% of the regression estimates indicated that increasing the number of identical individual resulting from asexual reproduction decreased the female reproductive success. Concerning the parameter for testing compatibility ($nCA(x)$), half of the estimates were negative and half of the estimates were positive. Significant estimates were negative. Considering the aggregation parameters ($mDist(x)$ and $varDist(x)$, $mDistCA(x)$ and $varDistCA(x)$, $mDistH(x)$ and $varDistH(x)$, $mDistD(x)$ and $varDistD(x)$), all significant results and signs of the estimates argued for the fact that aggregation favoured the fructification, except in the case of compatible alleles. Indeed, the tendency was the contrary: when compatible alleles are distant, fructification increases. The phenotypic characteristics of the studied trees in relation to the neighbourhood ones also showed some tendencies. When the number of neighbours of bigger diameter increased surrounding a tree, its fructification clearly increased. Besides, the increase of the number of higher trees in the neighbourhood showed a small tendency to decrease the fructification.

Discussion

The *P. avium* flower-into-fruits rate was lower than previously found in other *Prunus* species (*P. mahaleb* Guitian 1993; *P. spinosa* 38.9% to 46.5%, Guitian *et al.* 1993; *P. amygdalus* 39.5% to 51% Company *et al.* 2005). However, cited species are known to be partially self-fertile while our population of *P. avium* exhibits only functional GSI-alleles, which can limit the number of available mates. Besides, the mean proportion of flowers successfully pollinated into fruits was comparable to the rate found by Morales & Galetto (2003) for woody or self-incompatible plants. As the study was conducted during one season, we could not establish whether this low fructification can be due to an annual effect. As a common part of the woody plant species (Herrera *et al.* 1998; Parciak 2002), most of the *Prunus* species are known to alternate high and low fruit production years (see for example: *P. mahaleb* Jordano 1993; *P. virginiana* Parciak 2002; Company *et al.* 2005). The phenomenon of alternate bearing years could explain the absolute low fructification we observed.

In our study, individuals also exhibited high variation in their fructification. Such individual variations are common in Rosaceae species (Ågren 1988; Jordano 1995). However, contrary to previous studies on *Prunus* species (Jordano 1993), we did not find any correlation between the ability of the individuals to transform their flowers into fruits with their height, their diameter at breast or the number of ramets of the genotype. Then we explored whether inter-individual fructification variation could be explained by the genetical and ecological characteristics of the surrounding trees.

The general model designed to test if the asexual reproduction, the genetic compatibility, the aggregation and the phenotypic characteristics of the neighbourhood influence the individual fructification was not significant for most of the neighbourhood sizes considered. A possible explanation is that such influences were diluted by other factors, since we chose to work in field conditions. Nevertheless, some tendencies were distinguished.

Our results showed a clear tendency about the asexual impact on the female reproductive success. Asexual reproduction seemed to lower the female component of the individual reproductive success. Two interpretations can be suggested for those observations. First, asexual reproduction may have a cost and could limit the resource allocation to sexual reproduction (Bond & Miggley 2003). Second, in the case of asexuality combined with GSI, asexual spreads increase the probability of geitonogamy. In GSI species, all geitonogamous or self-pollinations are unfertile. Asexual reproduction may increase the fruitless proportion of pollinator visitations due to the GSI (Eckert 2000; Reusch 2001). However, in some conditions such as foundation events or spatial isolations, asexual reproduction could enhance the sexual reproduction by increasing the attraction of their pollinators (visibility and rewards) and by maintaining the genotype till conditions more favourable to sexual reproduction (DesRochers & Lieffers 2001). Our experiment was not designed to integrate this advantage gained by the genotype to survive and reproduce sexually through several sexual generations. The number of compatible alleles surrounding a tree seemed not to influence the fructification. This tendency is surprising since the literature reports that the reproduction of a high number of self-incompatible species seems to be limited by the availability of compatible alleles (Byers & Meagher 1992; House 1992; Shibayama & Kadono 2003; Brys *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005). However, our population exhibited 17 S-alleles among 247 individuals and 117 genotypes. In addition, the population was structured such as the entire studied tree presented at least one compatible allele in their vicinity. Wild cherry trees as homomorphic self-incompatible species could be less sensitive to the number and the spatial distribution of the mating types than heteromorphic species which bear less mating types per population (Wang *et al.* 2005). In wild cherry, a GSI species, the fructification of the studied population seemed not to be limited by the availability of the compatible alleles.

Most of the neighbourhood sizes and all the significant results showed that aggregation favoured fructification. When the mean distance separating one individual from his nearest neighbours increased, the proportion of flowers successfully pollinated into fruits showed the tendency to decrease. In addition, when the variance of the distance separating one individual from his nearest neighbours decreased, the fructification showed tendencies to be better. Those tendencies argue for a reproductive Allee effect (correlation between the individual ability to successfully reproduce and the local density of conspecific) in our wild cherry population. It has been shown that the majority of plants exhibit pollination failure (Wilcock & Neiland 2002), implying that stigmas received insufficient pollen to fertilize all available ovules. Most of plants produce more flowers than the available pollinators could fertilize. In consequence, an intraspecific competition occurs to recruit pollinators which results in individual variations in the ability to successfully pollinate flowers into fruits (Larson & Barrett 2000; Ashman *et al.* 2004; Knight *et al.* 2005). Wild cherry trees produce entomophilous (nonspecialized melitophilous) flowers. Their reproductive success should be largely determined by the number and the foraging behavior of their pollinators. Both foraging theory (Charnov 1976; Pyke 1980) and observations demonstrated that flowering plants at small density provided less rewards (pollen, nectar, landscape visibility for sexual recruitment), are less attractive and so less visited by pollinators than ones at higher density (Schaal 1978; Thomson 1981; Sih & Baltus 1987; Klinkhamer & de Jong 1990; Kunin 1993, 1997). Consequently, when the inter-individual distance increases, the plant reproduction could suffer from a lack of pollen transfer which decreases the individual seed set (e.g. Groom 1998; Matsumura & Washitani 2000; LeCadre *et al.* in prep.). As a scattered species, the spatial structure of wild cherry trees seems to be a strong predictor of the individual ability to successfully transform their flowers into fruits.

As for phenotypic characteristics of trees, our result showed that when a tree is surrounded by higher trees, its fructification seems to decrease. This may be interpreted by intraspecific competition to attract pollinators. On the contrary, when it is surrounded by bigger trees, its fructification increases. This may be interpreted by the good ability of these trees to produce pollen and pollinize the surrounding trees. In this case, we can predict that those trees should have a higher male reproductive success.

Conclusion

Looking at individual reproductive success, our data showed that the intrinsic characteristics of one tree could not be sufficient to explain its female reproductive success but they are best explained by the characteristics of the surrounding trees. Asexuality is not favourable to fructification whereas aggregation of trees seemed to increase it. The compatibility of the surrounding trees did not seem to influence the fructification of the trees we studied. The phenotypic characteristics of the surrounding trees seem to influence fructification.

References

- Agren J (1988) Between-Year Variation in Flowering and Fruit-Set in Frost-Prone and Frost-Sheltered Populations of Dioecious Rubus-Chamaemorus. *Oecologia* **76**, 175-183.
- Agren J (1996) Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb Lythrum salicaria. *Ecology* **77**, 1779-1790.
- Aigner PA (2004) Floral specialization without trade-offs: Optimal corolla flare in contrasting pollination environments. *Ecology* **85**, 2560-2569.
- Allee WC, Emerson AE, Park O, Park T, Schmidt KP (1949) *Principals of animal ecology*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Ashman TL, Morgan MT (2004) Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**, 553-559.
- Aspinwall N, Christian T (1992) Clonal Structure, Genotypic Diversity, and Seed Production in Populations of Filipendula-Rubra (Rosaceae) from the Northcentral United-States. *American Journal of Botany* **79**, 294-299.
- Barrett SCH (2002) The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* **3**, 274-284.
- Bond WJ, Midgley JJ (2001) Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 45-51.
- Brys R, Jacquemyn H, Endels P, *et al.* (2004) Reduced reproductive success in small populations of the self-incompatible Primula vulgaris. *Journal of Ecology* **92**, 5-14.
- Byers DL, Meagher TR (1992) Mate Availability in Small Populations of Plant-Species with Homomorphic Sporophytic Self-Incompatibility. *Heredity* **68**, 353-359.
- Charnov EL (1976) Optimal Foraging, Marginal Value Theorem. *Theoretical Population Biology* **9**, 129-136.

- Company RSI, Aparisi JG, Alonso JM (2005) Year and enclosure effects on fruit set in an autogamous almond. *Scientia Horticulturae* **104**, 369-377.
- De Nettancourt D (2001) *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*, 2nd edn. Springer, Berlin.
- Dejong TJ, Waser NM, Klinkhamer PGL (1993) Geitonogamy - the Neglected Side of Selfing. *Trends in Ecology & Evolution* **8**, 321-325.
- DesRochers A, Lieffers VJ (2001) The coarse-root system of mature *Populus tremuloides* in declining stands in Alberta, Canada. *Journal of Vegetation Science* **12**, 355-360.
- Ducci F, Santi F (1997) The distribution of clones in managed and unmanaged populations of wild cherry (*Prunus avium*). *Canadian Journal of Forest Research* **27**, 1998-2004.
- Eckert CG, Massonnet B, Thomas JJ (2000) Variation in sexual and clonal reproduction among introduced populations of flowering rush, *Butomus umbellatus* (Butomaceae). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **78**, 437-446.
- Ghazoul J (2005) Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 367-373.
- Groom MJ (1998) Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist* **151**, 487-496.
- Guitian J (1993) Why *Prunus-Mahaleb* (Rosaceae) Produces More Flowers Than Fruits. *American Journal of Botany* **80**, 1305-1309.
- Guitian J, Guitian P, Sanchez JM (1993) Reproductive-Biology of 2 *Prunus* Species (Rosaceae) in the Northwest Iberian Peninsula. *Plant Systematics and Evolution* **185**, 153-165.
- Harder LD, Barrett SCH (1995) Mating Cost of Large Floral Displays in Hermaphrodite Plants. *Nature* **373**, 512-515.

- Herrera CM, Jordano P, Guitian J, Traveset A (1998) Annual variability in seed production by woody plants and the masting concept: Reassessment of principles and relationship to pollination and seed dispersal. *American Naturalist* **152**, 576-594.
- Honnay O, Bossuyt B (2005) Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? *Oikos* **108**, 427-432.
- House SM (1992) Population-Density and Fruit-Set in 3 Dioecious Tree Species in Australian Tropical Rain-Forest. *Journal of Ecology* **80**, 57-69.
- Jordano P (1993) Pollination Biology of Prunus-Mahaleb L - Deferred Consequences of Gender Variation for Fecundity and Seed Size. *Biological Journal of the Linnean Society* **50**, 65-84.
- Jordano P (1995) Frugivore-Mediated Selection on Fruit and Seed Size - Birds and St Lucies Cherry, Prunus Mahaleb. *Ecology* **76**, 2627-2639.
- Klinkhamer PGL, Dejong TJ (1990) Effects of Plant Size, Plant-Density and Sex Differential Nectar Reward on Pollinator Visitation in the Protandrous Echium-Vulgare (Boraginaceae). *Oikos* **57**, 399-405.
- Klinkhamer PGL, Dejong TJ (1993) Attractiveness to Pollinators - a Plants Dilemma. *Oikos* **66**, 180-184.
- Knight TM, Steets JA, Vamosi JC, *et al.* (2005) Pollen limitation of plant reproduction: Pattern and process. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **36**, 467-497.
- Kunin WE (1993) Sex and the Single Mustard - Population-Density and Pollinator Behavior Effects on Seed-Set. *Ecology* **74**, 2145-2160.
- Kunin WE (1997) Population size and density effects in pollination: Pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of Brassica kaber. *Journal of Ecology* **85**, 225-234.

- Larson BMH, Barrett SCH (2000) A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **69**, 503-520.
- LE Cadre S, Bessa-Gomes C, Stoeckel S, Machon N. (in prep.) Allee effect and plant evolutionary ecology and conservation.
- Matsumura C, Washitani I (2000) Effects of population size and pollinator limitation on seed-set of *Primula sieboldii* populations in a fragmented landscape. *Ecological Research* **15**, 307-322.
- Morales CL, Galetto L (2003) Influence of compatibility system and life form on plant reproductive success. *Plant Biology* **5**, 567-573.
- Oddou-Muratorio S, Klein EK, Austerlitz F (2005) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent-offspring analysis. *Molecular Ecology* **14**, 4441-4452.
- Parciak W (2002) Environmental variation in seed number, size, and dispersal of a fleshy-fruited plant. *Ecology* **83**, 780-793.
- Pesson P, Louveaux J (1984) *Pollinisation et productions végétales* INRA Paris.
- Pyke GH (1980) Optimal Foraging in Bumblebees - Calculation of Net Rate of Energy-Intake and Optimal Patch Choice. *Theoretical Population Biology* **17**, 232-246.
- Reusch TBH (2001) Fitness-consequences of geitonogamous selfing in a clonal marine angiosperm (*Zostera marina*). *Journal of Evolutionary Biology* **14**, 129-138.
- Schaal BA (1978) Density Dependent Foraging on *Liatris-Pycnostachya*. *Evolution* **32**, 452-454.
- Shibayama Y, Kadono Y (2003) Floral morph composition and pollen limitation in the seed set of *Nymphoides indica* populations. *Ecological Research* **18**, 725-737.
- Sih A, Baltus MS (1987) Patch Size, Pollinator Behavior, and Pollinator Limitation in Catnip. *Ecology* **68**, 1679-1690.

- Sonneveld T, Robbins T, Tobutt K (*in press*) Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron PCR products. *Plant Breeding*.
- Sonneveld T, Tobutt KR, Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1059-1070.
- Steffan-Dewenter I, Tschardt T (1999) Effects of habitat isolation on pollinator communities and seed set. *Oecologia* **121**, 432-440.
- Tarasjev A (2005) Impact of genet size and flowering stage on fruit set in *Iris pumila* L. clones in wild. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **27**, 93-98.
- Thomson JD (1981) Spatial and Temporal Components of Resource Assessment by Flower-Feeding Insects. *Journal of Animal Ecology* **50**, 49-59.
- Ushimaru A, Kikuzawa K (1999) Variation of breeding system, floral rewards, and reproductive success in clonal *Calystegia* species (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* **86**, 436-446.
- Waits LP, Luikart G, Taberlet P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* **10**, 249-256.
- Wang Y, Wang QF, Guo YH, Barrett SCH (2005) Reproductive consequences of interactions between clonal growth and sexual reproduction in *Nymphoides peltata*: a distylous aquatic plant. *New Phytologist* **165**, 329-335.

Acknowledgements

We thank Camille Couteau (*Cemagref*), Olivier Fouché (Accrobranche[®]) and Sandrine Toussaint (*Cemagref*) for their help to measure fructification on the field.

Table 1: Fructification values.

| Tree | Number of flowers | Number of fruits | Fructification values |
|------|-------------------|------------------|-----------------------|
| 22 | 1103 | 101 | 0,092 |
| 25 | 797 | 0 | 0,000 |
| 47 | 1628 | 74 | 0,045 |
| 65 | 1723 | 18 | 0,010 |
| 81 | 691 | 1 | 0,001 |
| 97 | 656 | 2 | 0,003 |
| 107 | 1350 | 36 | 0,027 |
| 127 | 827 | 26 | 0,031 |
| 130 | 1304 | 6 | 0,005 |
| 132 | 1691 | 147 | 0,087 |
| 163 | 732 | 3 | 0,004 |
| 164 | 1223 | 31 | 0,025 |
| 172 | 998 | 27 | 0,027 |
| 196 | 908 | 0 | 0,000 |
| 217 | 1679 | 13 | 0,008 |
| 304 | 671 | 3 | 0,004 |
| 146p | 832 | 6 | 0,007 |
| 176m | 1137 | 15 | 0,013 |
| 176p | 1719 | 237 | 0,138 |
| 216p | 970 | 14 | 0,014 |
| 282p | 2135 | 53 | 0,025 |

Table 2: Sign of estimates and percentage of significant estimates in the fructification regression analyses

| Parameters | Percentage of positive estimate | Percentage of positive estimate with p-value inferior to 0.05 | Percentage of negative estimate | Percentage of negative estimate with p-value inferior to 0.05 |
|-------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------------|---|
| $nC(x)$ | 2.82 | 0 | 97.18 | 2.07 |
| $nCA(x)$ | 50.40 | 0 | 49.60 | 6.50 |
| $mDistCA(x)$ | 85.08 | 28.44 | 14.92 | 2.70 |
| $\text{var } DistCA(x)$ | 60.89 | 8.06 | 39.11 | 0 |
| $mDist(x)$ | 19.76 | 0 | 80.24 | 9.05 |
| $\text{var } Dist(x)$ | 39.92 | 0 | 60.08 | 18.79 |
| $nH(x)$ | 30.65 | 0 | 69.35 | 0 |
| $mDistH(x)$ | 12.50 | 0 | 87.50 | 15.21 |
| $\text{var } DistH(x)$ | 65.73 | 11.37 | 34.27 | 12.94 |
| $nD(x)$ | 94.76 | 8.53 | 5.24 | 0 |
| $mDistD(x)$ | 27.82 | 1.42 | 72.18 | 3.91 |
| $\text{var } DistD(x) D_var$ | 44.76 | 0.95 | 55.24 | 6.57 |

Annexe 4

Article original

TITRE

Stratégies raisonnées d'échantillonnage pour capturer la diversité génétique et sa structuration dans les populations naturelles – Application aux mesures de gestion conservatoire

TITRE COURANT

Echantillonnage de la diversité génétique et gestion conservatoire

AUTEURS

Stéphanie BRACHET^(1*), Catherine BASTIEN⁽²⁾, Isabelle BILGER⁽³⁾, Corinne BURET⁽²⁾, Jean DUFOUR⁽²⁾, Jérôme GRANGE^(3,5), Vanina GUERIN⁽²⁾, Véronique JORGE⁽²⁾, Bénédicte LE GUERROUE⁽⁴⁾, Marie-Claude LESAGE-DESCAUSES⁽²⁾, Laurent LEVEQUE⁽⁴⁾, Irinel MARDARE⁽²⁾, Stéphanie MARIETTE^(3§), Brigitte MUSCH⁽⁴⁾, Leopoldo SANCHEZ⁽¹⁾, Solenn STOECKEL^(3,5), Marc VILLAR⁽¹⁾ et Frédérique SANTI⁽¹⁾

ADRESSES

⁽¹⁾ ENGREF – Arboretum national des Barres

Domaine des Barres – 45290 NOGENT SUR VERNISSON

⁽²⁾ UR 588 Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières - INRA

Avenue de la Pomme de Pin – Ardon – BP 20619 – 45166 OLIVET CEDEX

⁽³⁾ Cemagref de Nogent

Domaine des Barres – 45290 NOGENT SUR VERNISSON

⁽⁴⁾ ONF – Conservatoire génétique des arbres forestiers USC INRA – Centre INRA

Avenue de la Pomme de Pin – Ardon – BP 20619 – 45166 OLIVET CEDEX

⁽⁵⁾ Université Paris XI, UMR 8079, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, Bât. 360, 91405 ORSAY

§ Présente adresse :UR 419 Espèces fruitières et Vigne - INRA

Domaine de la Grande-Ferrade – BP 81 – 33883 VILLENAVE D'ORNON CEDEX

AUTEUR CORRESPONDANT

Stéphanie BRACHET – mél : brachet@engref.fr

ABSTRACT

Sampling of natural genetic diversity for optimal structure and diversity capturing – applications to resource conservation policies

Both environmental and evolutionary factors determine the distribution of the genetic diversity among and within natural populations of forest tree species, resulting in genetically structured metapopulations. The existence of such distribution has major implications for resource conservation policies, as the shape and extent of *in situ* natural networks and the composition of *ex situ* collections of valuable forest tree species. A major and realistic issue we face is how to effectively sample natural variation both for optimal structure mirroring and for maximal genetic diversity capturing when designing *in situ* population networks and *ex situ* collections. Genetic differentiation descriptors like F_{st} and Q_{st} represent the utmost visible consequences of underlying landscape and evolution factors acting on the metapopulation genetic diversity. The first question we address here is how to sample populations, individuals and marker loci knowing the neutral and selected genetic structure of a theoretically built metapopulation. Results of a Monte-Carlo allele-based simulation model are presented, where the sample of populations, individuals and marker loci was simultaneously modelled over ranges of F_{st} and Q_{st} . Each sample strategy was not only evaluated in terms of genetic diversity potential yield relative to total diversity at the metapopulation level, but also in terms of bias and precision rendering in the estimation of F_{st} and Q_{st} from the actual sample. Thus the ability of the sample to render both the diversity and its distribution over the populations was analyzed. The second question we address is whether present *ex situ* collections of two disseminated forest tree species, black poplar and wild cherry, represent a good sampling of natural populations. For that purpose, natural populations and *ex situ* collections were characterised with neutral markers and phenotypic characters. The simulations then serve to infer the degree of representativeness of existing *ex situ* collections for the two species based on the actual sample sizes and several differentiation estimates of F_{st} and Q_{st} , and eventually guide the enrichment of conservation resources for these two species.

KEY WORDS : sampling / genetic diversity / differentiation / Prunus / Populus

RESUME

La diversité génétique d'une espèce se distribue entre populations et à l'intérieur des populations. Sa prise en compte à ces deux niveaux a une importance majeure pour la mise en place de modes de gestion conservatoires *in situ* et *ex situ*. La question principale qui se pose est : quel échantillonnage de la diversité faire, en terme de populations, d'individus et de gènes ? Nous abordons ici cette question, d'un point de vue théorique à travers le développement d'un modèle Monte-Carlo, puis d'un point de vue expérimental sur deux espèces forestières, le merisier et le peuplier noir, à travers une comparaison de la diversité présente en populations naturelles et en collection *ex situ*. Les deux approches sont ensuite mises en regard l'une de l'autre afin de donner des éléments sur les stratégies d'échantillonnage optimales de la diversité de ces deux espèces.

MOTS CLES : échantillonnage / diversité génétique/ différenciation / Prunus / Populus

1. Introduction

La diversité génétique globale d'une espèce peut se décomposer en deux niveaux : la diversité présente à l'intérieur de chaque population et le degré de différenciation entre populations. Elle peut se mesurer au niveau de l'ADN et est alors caractérisée classiquement par l'hétérozygotie et la richesse allélique ou à travers la quantification de la variance entre phénotypes pour différents traits de caractères. La différenciation entre populations, elle, est classiquement estimée pour les loci, par le paramètre de différenciation des fréquences alléliques F_{ST} et pour les phénotypes, par le paramètre Q_{ST} . Les deux niveaux de diversité sont déterminés à la fois par des facteurs évolutifs et environnementaux, notamment pour les caractères adaptatifs. La mise en place de collections de ressources génétiques *ex situ* ou de réseaux de conservation *in situ* devrait reposer sur la connaissance de la distribution intra et inter populations de la diversité, car ce sont les différences entre individus ayant une signification évolutive que l'on souhaite généralement conserver [13].

La question inhérente est alors : quel échantillonnage démographique et génétique faire pour constituer collections et réseaux ? Des modèles ont d'ores et déjà examiné tout ou partie de cette question comme celui de Bataillon *et al.* [1]. La plupart de ces modèles reposent sur la modélisation de l'ensemble des facteurs évolutifs pré-cités. Dans ce projet, nous avons posé cette question en partant de la connaissance *a priori* de la différenciation génétique neutre (F_{ST}) et adaptative (Q_{ST}) des populations. Notre approche cherche à déterminer : (i) l'échantillonnage optimal à mener pour estimer au mieux la variabilité génétique intra et inter populations d'une espèce donnée, (ii) l'échantillonnage optimal des individus à faire pour constituer une collection *ex situ* d'une taille donnée représentant, à un temps donné, le maximum de diversité génétique de l'espèce, une fois cette dernière estimée.

Dans les faits, des collections *ex situ* ou des réseaux *in situ* de ressources génétiques ont d'ores et déjà été constitués en se basant principalement sur des critères écologiques. C'est particulièrement le cas des arboreta ou de certaines collections d'arbres forestiers, qui ont été mis en place sans connaissance *a priori* de la variabilité génétique. Dans ce projet, nous avons alors voulu examiner si des collections *ex situ* de deux arbres forestiers à distribution discontinue, le merisier et le peuplier noir, constituées uniquement sur la connaissance de l'origine géographique des individus représentaient un échantillonnage adéquat de la diversité des populations naturelles et s'il faut, au besoin, les revoir.

Nous présentons ici des éléments de réponse apportés par le modèle quant aux modalités d'échantillonnage théoriquement optimal pour estimer variabilité et différenciation. Nous les complétons par les premières estimations de la diversité et de la différenciation en populations naturelles et en collection chez le merisier et le peuplier noir. Nous confrontons enfin les recommandations théoriques aux échantillonnages concrets qui ont été faits sur les deux modèles biologiques.

2. Stratégies d'échantillonnage : approche théorique

2.1. Description du modèle

Notre étude théorique est basée sur des simulations de type Monte Carlo. La figure 1 représente schématiquement le modèle et précise les paramètres fixés.

Un pool de gènes est d'abord créé à partir d'un certain nombre de paramètres fixés initialement (Cf. Figure 1). Pour plus de clarté, seuls deux cas distincts sont présentés ici : le cas A suppose que tous les loci sont identiques (fréquence, effets alléliques), le cas B, que les loci sont différents, ce qui se rapproche plus de la réalité. Il est par ailleurs supposé que la répartition des loci dans le génome est homogène et qu'ils sont indépendants. Il n'y a pas de déséquilibre de liaison, ni de dominance. Le pool de gènes créé est ensuite réparti aléatoirement dans une métapopulation initiale (avec des valeurs de F_{ST} et Q_{ST} proches de 0),

constituée d'un nombre de populations défini, chaque population ayant un nombre d'individus défini. Pour obtenir une métapopulation correspondant à un couple (Fst, Qst) donné, une méthode d'optimisation appelée « recuit simulé » (ou Simulated Annealing) [12] est alors appliquée. Cette méthode consiste en une grande série d'itérations ($> 10^6$), qui chacune est une légère modification de la composition génotypique de la métapopulation par échanges d'allèles entre populations. Selon les valeurs de Fst et Qst calculées sur la nouvelle métapopulation obtenue à la fin de chaque itération et un critère de convergence donné par la fonction probabiliste de Boltzmann, la modification est retenue ou rejetée. Lorsque aucune modification ne peut améliorer la convergence vers les valeurs de Fst et Qst souhaitées, le processus d'itération s'arrête. La métapopulation ainsi obtenue est alors considérée comme la « vraie » métapopulation, caractérisée par un couple (Fst_M, Qst_M) donné et un nombre total et efficace d'allèles.

Une série d'échantillonnage est alors simulée afin de déterminer les meilleures stratégies d'échantillonnage. Chaque échantillonnage consiste en un tirage sans remise des populations, puis des individus dans les populations choisies et des loci. Le tirage des loci neutres détermine le nombre de marqueurs neutres utilisés. Pour les loci sélectionnés, il n'y a pas de tirage aléatoire, la valeur génotypique des individus étant considérée comme connue. Pour chaque couple (Fst_M, Qst_M) donné, 30 métapopulations sont construites et pour chaque métapopulation, la stratégie d'échantillonnage est répétée 10 000 fois.

Afin d'évaluer la stratégie d'échantillonnage, les moyennes et variances des variables génétiques suivantes : Hs (hétérozygotie intra-population), Ht (hétérozygotie totale), Fst, Qst, Ae (nombre efficace d'allèles), A (nombre total d'allèles) sont calculées et un échantillon de 150 répétitions est retenu pour analyser les courbes de distribution de chaque variable génétique ainsi que leurs intervalles de confiance. La comparaison avec la « vraie » métapopulation sur ces variables génétiques est faite en calculant la différence entre les valeurs moyennes estimées sur les échantillons pour chaque stratégie d'échantillonnage et les valeurs calculées sur la métapopulation définie par un couple (Fst_M, Qst_M) donné. Le biais d'échantillonnage est alors analysé en fonction des facteurs suivants : nombre de populations échantillonnées, nombre d'individus échantillonnés par population, nombre de loci ou marqueurs neutres échantillonnés et valeur du Fst de la « vraie » métapopulation (Fst_M).

2.2. Résultats

Les résultats obtenus pour le cas A (loci identiques) sont illustrés par les Figures 2 à 5. La Figure 2 montre les biais obtenus sur les variables Ht, Hs et Fst en fonction du nombre de populations, du nombre d'individus et des valeurs de Fst_M. Un biais négatif indique une sous-estimation liée à l'échantillonnage. Concernant la valeur de Ht, on observe qu'il est toujours sous-estimé par l'échantillonnage (Figure 2a). Une diminution du nombre de populations échantillonnées (de 8 à 2 sur 10) entraîne une augmentation de la sous-estimation de Ht. Une réduction du nombre d'individus a, quant à elle, moins d'effet. Enfin, plus la valeur du Fst de la métapopulation est grande, plus la valeur de Ht est sous-estimée. A contrario, la valeur de Hs est toujours surestimée (Figure 2b), particulièrement lorsque le nombre d'individus échantillonnés est faible et que la valeur du Fst_M est faible. La valeur du Fst est toujours sous-estimée par l'échantillonnage (Figure 2c). Cette sous-estimation est d'autant plus forte que le nombre de populations échantillonnées ou que le nombre d'individus diminue, en particulier pour des valeurs fortes du Fst_M. La Figure 3 présente les variations du biais sur le Fst en fonction du nombre de loci neutres, du nombre de populations et du nombre d'individus échantillonnés. L'échantillonnage des populations et des individus a un effet significatif, l'effet individu étant plus important pour de faibles valeurs du Fst_M, alors que pour de fortes valeurs, c'est l'effet population qui est plus important. Le Qst, quant à lui, est généralement sous-estimé et le nombre de populations échantillonnées est le seul facteur jouant sur son estimation (Figure 4). Enfin, la Figure 5 (a, b) présente l'effet de

l'échantillonnage sur les valeurs de A_e et A : le nombre de populations et d'individus échantillonnés ont un effet très significatif sur ces deux valeurs, la valeur du F_{st_M} jouant uniquement sur la valeur de A_e . L'analyse des mêmes résultats dans le cas B où les loci sont différents entre eux quant à la distribution des fréquences alléliques, au nombre efficace d'allèles et à la valeur de F_{st} (fixée par locus) montre un effet significatif du nombre de loci neutres échantillonnés. Cependant, l'effet du nombre de populations et du nombre d'individus échantillonnés reste prépondérant.

3. Données expérimentales en populations naturelles et *ex situ*

Deux espèces forestières combinant reproduction sexuée et asexuée ont été étudiées : le merisier (*Prunus avium* L., $2n=16$) de la famille des Rosacées, espèce entomophile disséminée dans toute la France ; le peuplier noir (*Populus nigra* L., $2n=38$) de la famille des Salicacées, espèce dioïque, anémophile et pionnière, inféodée aux ripisylves peu anthropisées. Chez le merisier, l'allogamie est favorisée par un système d'auto incompatibilité gamétophytique. Ces espèces peuvent avoir des densités très variable et représenter de 0 à presque 100% de la composition d'un peuplement. Elles possèdent toutes les deux un compartiment sauvage et cultivé, ce dernier comportant de nombreuses variétés, fruitières pour le merisier, ornementales et à finalité de production de bois pour le peuplier, introduites à grande échelle par l'homme.

3.1. Echantillonnage des populations et des collections

Six populations naturelles par espèce ont été échantillonnées. Pour le merisier (Figure 6), on distingue une population isolée (Pagny-le-Château), une population fragmentée (Neuillé-Pont-Pierre) et quatre populations appartenant à des massifs forestiers non fragmentés. Pour le peuplier (Figure 7), les populations sont incluses dans des peuplements linéaires présents le long du lit mineur et des chenaux secondaires des cours d'eau. Trois sont en altitude, avec des densités fortes pour Dranse et Nohède et faibles pour Eyne ; trois autres sont en plaine, avec une population dense à Ramière et deux populations fragmentées à St-Pryvé–St-Mesmin et en Ardèche. Tous les individus des collections nationales de référence ont été retenus, soit 359 individus pour le merisier et 304 pour le peuplier (Figure 7), originaires de la plupart des habitats naturels des espèces.

3.2. Echantillonnage et amplification des marqueurs

Pour le merisier, 12 marqueurs microsatellites qui couvrent 6 groupes de liaison sur 8 ont été utilisés (Tableau 1). Les allèles du système d'incompatibilité du locus S, situé sur le groupe de liaison 6, ont également été caractérisés. Pour le peuplier noir, 12 marqueurs microsatellites, répartis sur 11 des 19 groupes de liaisons de la seule carte génétique connue de *P. nigra* et deux marqueurs associés à des QTL de résistance à la rouille foliaire à *M. larici-populina* : PMGC667 chez *P. trichocarpa* [11] et PMGC433 chez *P. nigra* (V. Storme, com. pers.) ont été utilisés.

Pour les deux espèces, l'ADN génomique total a été extrait des feuilles en utilisant le kit d'extraction «Dneasy® Qiagen 96 plant kit». Les marqueurs microsatellites ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces marquées par des fluorophores (HEX, FAM et NED) selon les protocoles décrits par Stoeckel *et al.* [17] pour le merisier et Jorge *et al.* [11] pour le peuplier. Les allèles ont été séparés par migration dans un séquenceur capillaire (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer). Les génotypes ont été visualisés et lus avec deux logiciels : Genotyper® et/ou GeneScan®.

3.3. Analyse phénotypique de la résistance à la rouille foliaire du peuplier dans la collection

Pour le peuplier, une étude de la structuration géographique de la variabilité génétique de la résistance partielle à la rouille foliaire a été conduite pour deux isolats de *M. larici-populina* inoculés artificiellement en laboratoire. Trois composantes de la résistance partielle ont été

évaluées : la latence infectieuse (LP) correspondant au nombre de jours depuis l'inoculation jusqu'à l'apparition du premier urédosore sporulant, le nombre d'urédosores sporulants (UN) au 13^{ème} jour après inoculation et la taille relative des urédosores (US) au 14^{ème} jour après inoculation, notée à l'aide d'une échelle à 5 classes puis calibrée par analyse d'images de 15 disques par classe.

3.4. Analyse des données

Les valeurs de A et Ae par locus sur l'ensemble des populations, leur moyenne et leur écart-type sur l'ensemble des loci microsatellites ont été calculés. Le Fst de Weir et Cockerham [20] pour chaque marqueur, sa valeur pour l'ensemble des microsatellites et l'écart-type de cette valeur par jackknifing sur les loci ont été estimés (Fstat v2.9.3.2 [9]). En ce qui concerne le merisier, les calculs ont été effectués en ne prenant qu'un seul représentant par tache de drageonnage supposée. Pour les données phénotypiques, la statistique Qst a été estimée de la façon suivante : $Qst = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + \sigma_w^2)$ où σ_b^2 et σ_w^2 représentent respectivement la variance entre populations et la variance clonale [14].

3.5. Résultats

Pour le merisier, les résultats partiels obtenus sur 4 populations, 8 marqueurs microsatellites et le marqueur du S donnent un A observé variant de 4 à 20, avec une moyenne de 10,2 allèles par locus. Pour le peuplier, les résultats obtenus sur l'ensemble de la collection de référence et sur les 12 marqueurs microsatellites donnent un A observé qui varie de 12 à 49, avec une moyenne de 10,5 allèle par locus. La valeur du Fst aux marqueurs microsatellites est de 0,071 ($\pm 0,009$) pour le merisier et de 0,028 ($\pm 0,002$) pour le peuplier (Tableau 2). Pour les données phénotypiques obtenues sur la collection nationale, une héritabilité individuelle h^2_L (σ_G^2/σ_P^2) élevée reflète l'existence d'un contrôle génétique important pour l'ensemble des composantes de la résistance partielle à la rouille foliaire. Comme chez d'autres espèces de peuplier [7], c'est pour le niveau moyen de sporulation (taille des urédosores) que la variabilité génétique individuelle est la plus élevée chez le peuplier noir. Cependant aucune structuration géographique significative ne peut être mise en évidence pour aucune des composantes étudiées (Tableau 3).

4. Discussion

4.1. Résultats théoriques

L'analyse des stratégies d'échantillonnage a montré que les facteurs prépondérants à prendre en compte pour capturer au mieux la diversité génétique d'une espèce et sa structuration entre populations était le nombre de populations et le nombre d'individus échantillonnés. Le nombre de loci, lui, n'a un effet que lorsqu'il existe de la variance entre loci pour les différents paramètres les caractérisant mais ce dernier reste moins important que les facteurs d'échantillonnage démographique. Le nombre de populations échantillonnées a un effet d'autant plus fort sur le Fst et le Ae que la structuration de la métapopulation considérée est plus forte. En effet, ce facteur joue plus fortement sur l'hétérozygotie totale et une omission de quelques populations distinctes amène à sous-estimer celle-ci (intervenant dans le calcul de Fst et semblable au Ae). Le nombre d'individus échantillonnés est important lorsque la structuration de la diversité n'est pas très marquée entre populations, comme c'est le cas généralement chez les espèces forestières. Il n'a pas d'effet sur le Qst, du fait de l'hypothèse forte du modèle sur la connaissance de la valeur génotypique individuelle.

4.2. Stratégie d'échantillonnage expérimentale et résultats théoriques

Le Tableau 4 compare les valeurs des variables génétiques, Fst, Qst, Ae et A obtenues à partir de notre modèle (cas A et B) pour une stratégie d'échantillonnage similaire à celle utilisée pour l'estimation de la diversité génétique des populations naturelles de peuplier et de merisier. Les deux cas donnent des résultats proches, ce qui indique que le choix des marqueurs n'est pas capital à condition bien sûr qu'ils aient un minimum de polymorphisme.

Ainsi, dans le cas B, lorsque le coefficient de variation du F_{st} fixé entre loci est de 0.13, valeur comparable à celle estimée chez le peuplier et le merisier, l'estimation du F_{st} reste assez proche du cas A. Globalement, la distribution des valeurs de F_{st} montre qu'au moins 95% des valeurs sont supérieures à 0, celle des valeurs de Q_{st} a elle une amplitude plus large, en particulier pour des valeurs de Q_{st} de la métapopulation égale à 0.05, plus difficile à détecter. La stratégie d'échantillonnage choisie permet de capturer un nombre efficace d'allèles inférieur de 6.8 à 18.5% à celui calculé sur la « vraie » métapopulation et un nombre total d'allèles de l'ordre de 93%. Par conséquent, la stratégie d'échantillonnage adoptée pour les deux espèces semblent permettre simultanément une bonne estimation de la différenciation inter - populations et de la richesse allélique intra - population. Toutefois, il reste encore à les examiner plus en détail, en particulier au niveau des populations échantillonnées relativement aux populations réelles dont le nombre et la délimitation sont très difficiles à connaître. Ce point, couplé à d'autres modèles génétiques fera l'objet de prochaines analyses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Bataillon T.M., David J.L., Schoen D.J., Neutral genetic markers and conservation genetics: simulated germplasm collections, *Genetics* 144 (1996) 109-117.
- [2] Cervera M.T., Storme V., Ivens B. *et al.* Dense Genetic Linkage Maps of Three Populus Species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) Based on AFLP and Microsatellite Markers, *Genetics* 158 (2001) 787-809.
- [3] Cipriani G., Lot G., Huang W. *et al.* AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* L., Batsch) isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*, *TAG* 99 (1999) 65-72.
- [4] Clarke J.B., Tobutt K.R., Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* "Napoleon", *Mol. Ecol. Notes* 3 (2003) 578-580.
- [5] Dirlewanger E., Cosson P., Tavaud M. *et al.* Development of microsatellite markers in peach *Prunus persica* (L.) Batsch and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.), *TAG* 105 (2002) 127-138.
- [6] Dirlewanger E., Graziano E., Joobeur T. *et al.* Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops, *PNAS* 101 (2004) 9891-9896.
- [7] Dowkiw A., Husson C., Frey P. *et al.*, Partial resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: genetic variability in inoculated excised leaf disk bioassay and relationship with complete resistance, *Phytopath.* 93 (2003) 421-427.
- [8] Downey S.L., Iezzoni A.F., Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry, *J. Am. Soc. Horti. Sci.* 125 (2000) 76-80.
- [9] Goudet J., FSTAT (Version 1,2): A computer program to calculate F-statistics, *J. Hered.* 86 (1995) 485-486.
- [10] Joobeur T., Periam N., Vicente M.C., King G.J., Arus P., Development of a second generation linkage map for almond using RAPD and SSR markers, *Genome* 43 (2000) 649-655.
- [11] Jorge V., Dowkiw A., Faivre-Rampant P. *et al.*, Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection, *New Phytol.* 167 (2005) 113-127.
- [12] Kirkpatrick S., Gellat C.D.J., Vecchi M.P., Optimization by simulated annealing, *Science* 220-4598 (1983) 671-680.
- [13] Mc Kay J.K., Latta R.G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits, *TREE* 17 (2002) 285-291.

- [14] Spitze K., Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation, *Genetics* 135 (1993) 367-374.
- [15] Sonneveld T., Robbins T.P., Tobutt K.R., Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron PCR products, *Plant Breeding* (sous presse),
- [16] Sosinski B., Gannavarapu M., Hager L.D. *et al.* Characterization of microsatellite markers in peach *Prunus persica* (L.) Batsch, TAG 101 (2000) 421-428.
- [17] Stoeckel S., Grange J., Fernandez-Manjarres J.F., Bilger I., Frascaria-Lacoste N., Mariette S., Heterozygote excess in a self-incompatible and partially forest tree species – *Prunus avium* L, *Mol. Ecol.* (sous presse).
- [18] Testolin R., Marrazzo T., Cipriani G. *et al.* Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L, Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars, *Genome* 43 (2000) 512-520.
- [19] Vaughan S.P., Russell K., Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*, *Mol. Ecol. Notes* 4 (2004) 429-431.
- [20] Weir B.S., Cockerham C.C., Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution* 38 (1984) 1358-1370.

TABLEAUX

Tableau 1 : Marqueurs utilisés pour chacune des espèces avec leur localisation sur les groupes de liaison (GL).

| Marqueur | Référence | GL | Marqueur | Référence | GL |
|----------|-----------|------|-----------|-----------|-----|
| PMGC61 | [2] | VIII | UDP96-005 | [3] | I |
| PMGC2578 | [2] | VI | EMPA004 | [4] | I |
| PMGC2838 | [2] | V | UDP98-411 | [18] | II |
| PMGC2852 | [2] | I | PCEGA34 | [8] | II |
| PMGC333 | [2] | XI | BPPCT034 | [5] | II |
| PMGC486 | [2] | III | EMPa S02 | [19] | II |
| PMGC2156 | [2] | V | EMPA005 | [4] | III |
| WPMS05 | [2] | XII | BPPCT040 | [5] | IV |
| PMGC433 | [2] | XVI | PS12A02 | [16] [10] | IV |
| PMGC2235 | [2] | IV | EMPA018 | [4] | V |
| PMGC14 | [2] | XIII | UDP98-021 | [18] | VI |
| PMGC667 | [2] | II | UDP98-412 | [18] | VI |
| Locus S | | | | [15] | VI |

Tableau 2 : A, Ae et Fst estimées sur les 304 clones de peuplier noir structurés en 11 unités géographiques, pour 12 marqueurs microsatellites, et sur les 4 populations naturelles de merisier, pour 8 marqueurs microsatellites et le marqueur S.

| Marqueurs peuplier | A | Ae | Fst | Marqueurs merisier | A | Ae | Fst |
|--------------------|--------------|-------------|---------------|---------------------|--------------|-------------|--------------|
| PMGC61 | 13 | 6,99 | 0,0199 | UDP96-005 | 9 | 5,10 | 0,044 |
| PMGC2578 | 27 | 9,55 | 0,0201 | UDP98-411 | 8 | 3,14 | 0,124 |
| PMGC2838 | 13 | 1,70 | 0,0435 | PCEGA34 | 20 | 4,90 | 0,088 |
| PMGC2852 | 21 | 5,51 | 0,0284 | BPPCT034 | 14 | 2,92 | 0,084 |
| PMGC333 | 10 | 3,16 | 0,0272 | BPPCT040 | 8 | 5,03 | 0,070 |
| PMGC486 | 18 | 7,014 | 0,0248 | PS12A02 | 11 | 3,40 | 0,049 |
| PMGC2156 | 14 | 1,709 | 0,0356 | UDP98-021 | 4 | 7,94 | 0,067 |
| WPMS05 | 24 | 8,82 | 0,0265 | UDP98-412 | 8 | 4,61 | 0,047 |
| PMGC433 | 12 | 2,21 | 0,0281 | S | 19 | 11,61 | 0,035 |
| PMGC2235 | 19 | 6,31 | 0,0351 | | | | |
| PMGC14 | 13 | 4,54 | 0,0228 | | | | |
| PMGC667 | 48 | 10,97 | 0,0331 | | | | |
| Écart-type | 10,43 | 3,13 | 0,002 | | 4,86 | 1,61 | 0,009 |
| Total | 19,33 | 5,71 | 0,0277 | Total sans S | 10,25 | 4,63 | 0,071 |

Tableau 3 : Variabilité génétique et différenciation géographique pour différentes composantes de la résistance à la rouille foliaire (*M. larici-populina*) au sein de la collection de référence de peuplier noir.

| <u>Résistance à E1-98ID6</u> | h^2_L | Test F effet population | Q_{st} | <u>Résistance à E4-98AG69</u> | h^2_L | Test F effet population | Q_{st} |
|------------------------------|---------|-------------------------|----------|-------------------------------|---------|-------------------------|----------|
| Latence infectieuse | 0,42 | 1,16 ns | 0,001 | Latence infectieuse | 0,29 | 1,45 ns | 0,001 |
| Nb urédosores | 0,37 | 1,56 ns | 0,002 | Nb urédosores | 0,33 | 1,25 ns | 0,001 |
| Taille des urédosores | 0,55 | 0,59 ns | 0,0001 | Taille des urédosores | 0,44 | 0,30 ns | 0,0001 |

Tableau 4 : Statistiques des courbes de distribution des valeurs de Fst, Qst, A et Ae pour une stratégie d'échantillonnage correspondant à 4 populations sur 10, 40 individus par population sur 200 et 10 loci neutres sur 20, en fonction de plusieurs « vraies » métapopulations considérées et caractérisées par un couple (Fst_M, Qst_M).

(1) : Fst_M = 0.05, (2) : Fst_M = 0.15

| Cas A (loci identiques) | Fst | | Qst | | Ae | | A | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|--------------------|---------------|---------------|
| percentile 2.5% | 0,023 | 0,093 | -0,006 | 0,04 | 0,042 | 4,543 | 4,131 | 11,1 | 11,2 |
| moyenne | 0,033 | 0,121 | 0,051 | 0,137 | 0,237 | 4,922 | 4,725 | 11,577 | 11,589 |
| Valeur « vraie » | 0,05 | 0,15 | 0,05 | 0,15 | 0,25 | 5,07 | 5,07 | 12 | 12 |
| percentile 97.5% | 0,046 | 0,15 | 0,125 | 0,267 | 0,388 | 5,268 | 5,167 | 11,8 | 11,9 |
| Cas B (loci différents) | | | | | | | | | |
| percentile 2.5% | 0,016 | 0,078 | -0,009 | 0,011 | 0,06 | 4,702 | 4,357 | 9,8 | 9,2 |
| moyenne | 0,033 | 0,121 | 0,044 | 0,145 | 0,229 | 5,285 | 5,019 | 11,535 | 11,412 |
| Valeur « vraie » | 0,05 | 0,15 | 0,05 | 0,15 | 0,25 | 3,84 à 7,52 | 3,84 à 7,52 | 6 à 18 | 6 à 18 |
| percentile 97.5% | 0,047 | 0,167 | 0,122 | 0,286 | 0,4 | 5,939 | 5,867 | 13,4 | 13,3 |
| | | | | | | (1) | (2) | (1) | (2) |

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique du modèle d'échantillonnage. Dans les encadrés accentués, les paramètres fixés sont indiqués avec leurs valeurs. La distribution des fréquences alléliques aux loci neutres est supposée uniforme ou asymptotique et peut varier entre loci. Les valeurs de F_{st} sont fixées pour le génome entier ou par locus et les valeurs de Q_{st} sont fixées par trait. A : nombre total d'allèles, A_e : nombre efficace d'allèles.

Figure 2. Valeurs des biais pour H_t (2a), H_s (2b) et F_{st} (2c) en fonction du nombre de populations (POP_E), du nombre d'individus (IND_E) échantillonnés et du F_{st} de la « vraie » métapopulation (F_{st_M}).
(biais = valeur calculée sur l'échantillon – valeur calculée sur la « vraie » métapopulation)

Figure 3. Diagramme des biais du F_{st} pour différents niveaux d'échantillonnage des loci (LOC_E), des populations (POP_E), des individus (IND_E) et du F_{st} de la « vraie » métapopulation (F_{st_M}). Les valeurs minimales et maximales de chaque carré correspondent aux quartiles inférieures et supérieures, la moitié correspondant à la valeur médiane. Pour les facteurs significatifs, le calcul du F provenant d'une ANOVA à 3 facteurs ($POP_E \times IND_E \times LOC_E$) est donné.

Figure 4. Idem Figure 3 pour Q_{st} avec Q_{st_M} = valeur du Q_{st} de la « vraie » métapopulation

Figure 5. Idem Figure 3 pour A et A_e

Figure 6. Localisation géographique des populations naturelles échantillonnées de merisier

Figure 7. Localisation géographique des clones appartenant à la collection française de peuplier noir (309 clones symbolisés par des arbres et regroupés par provenance géographique) et des 6 populations naturelles échantillonnées (symbolisées par des étoiles, 1 : Ardèche ; 2 : Dranse ; 3 : Eyne ; 4 : Nohèdes ; 5 : Ramières ; 6 : St-Pryvé – St-Mesmim)

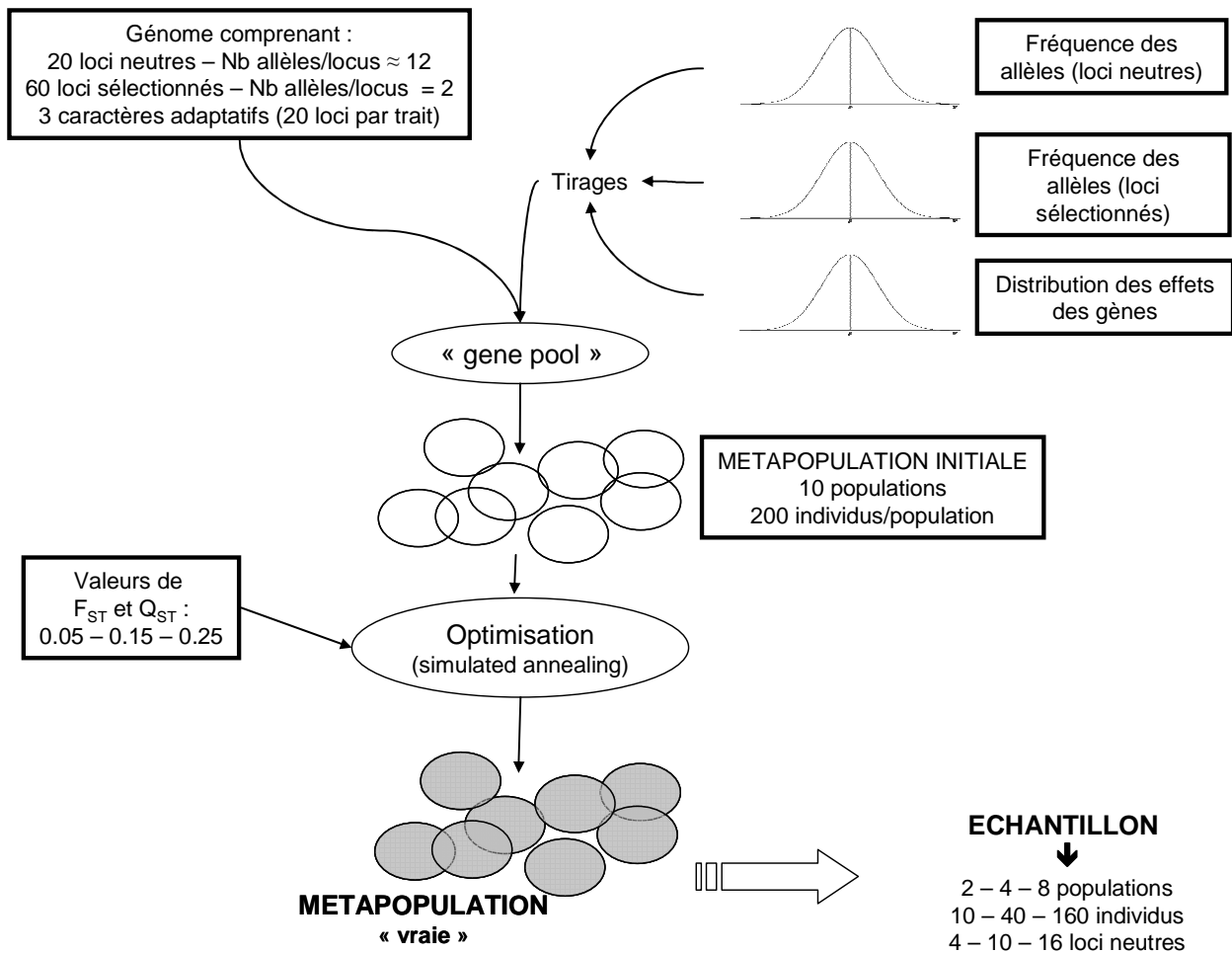


Figure 1

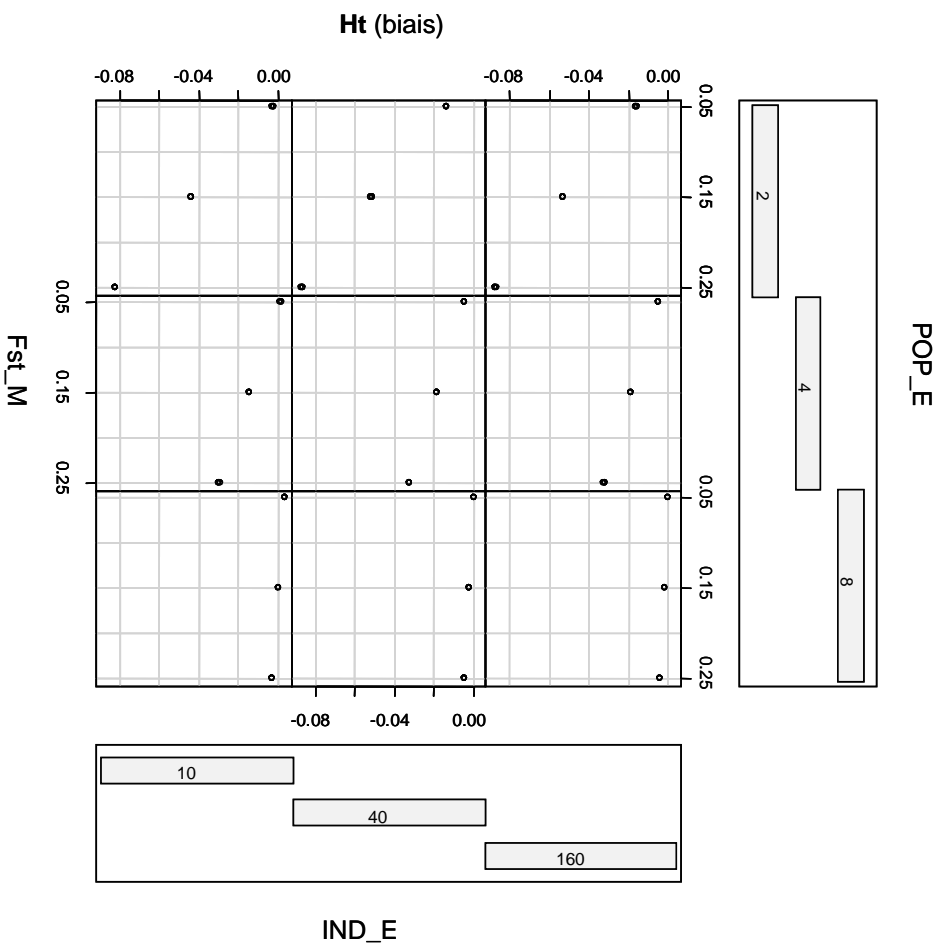


Figure 2a

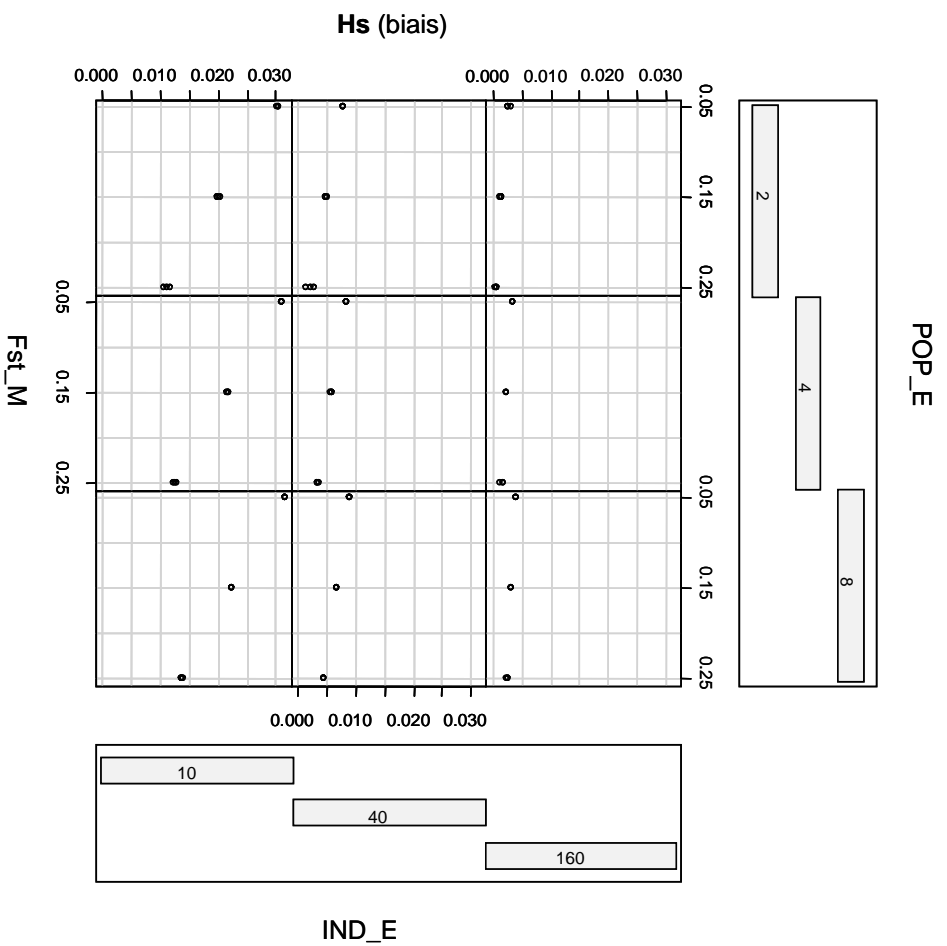


Figure 2b

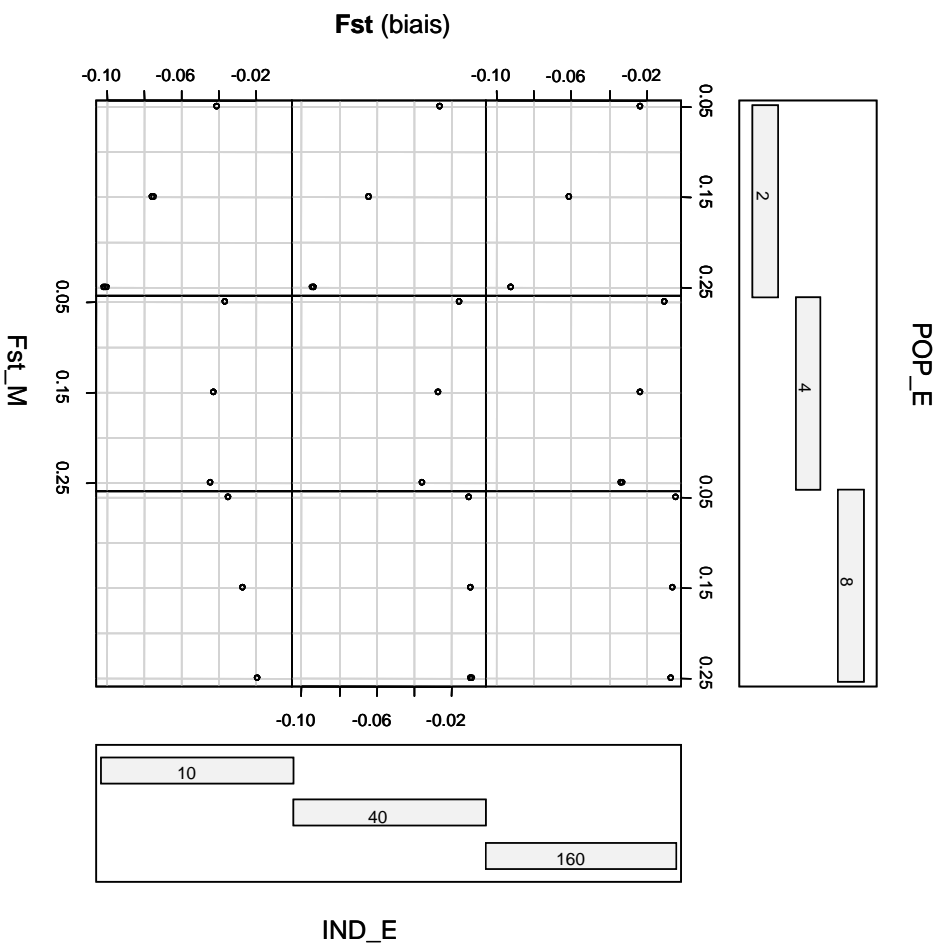


Figure 2c

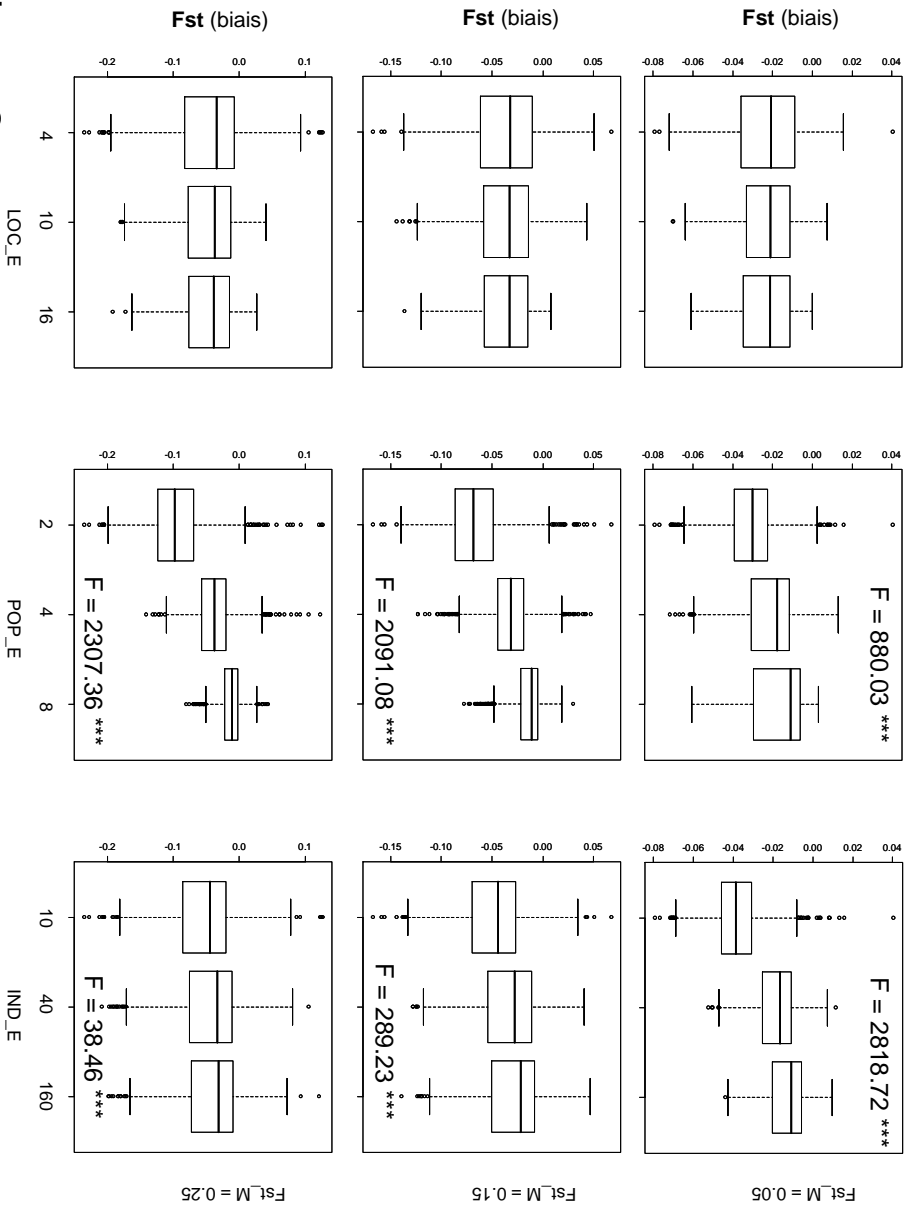


Figure 3

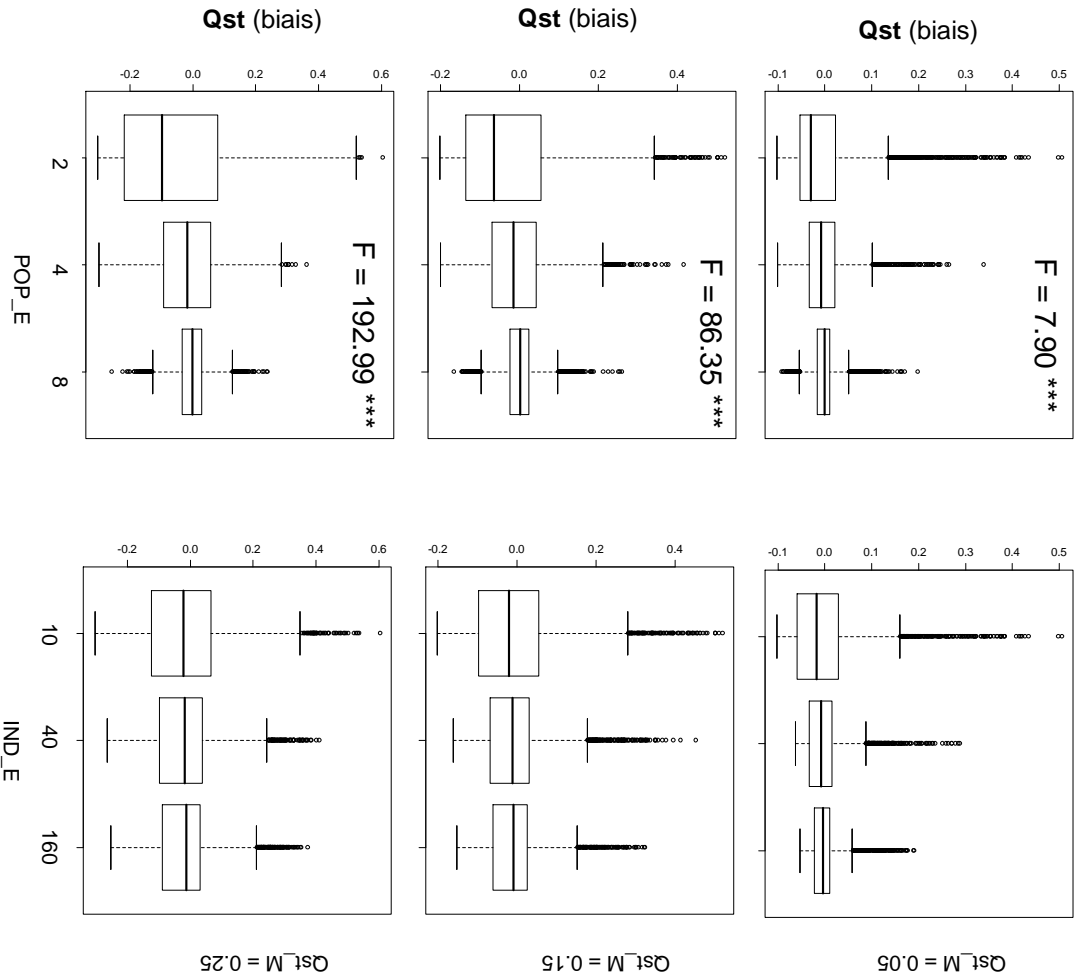


Figure 4

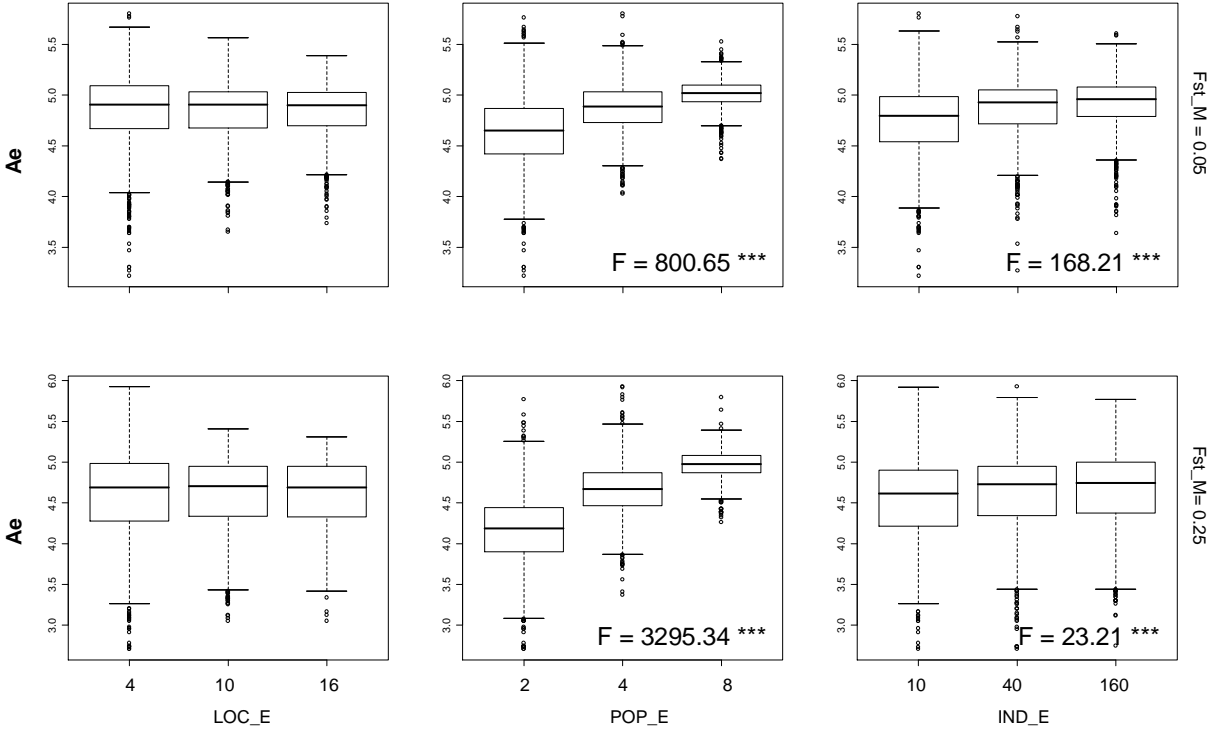


Figure 5a

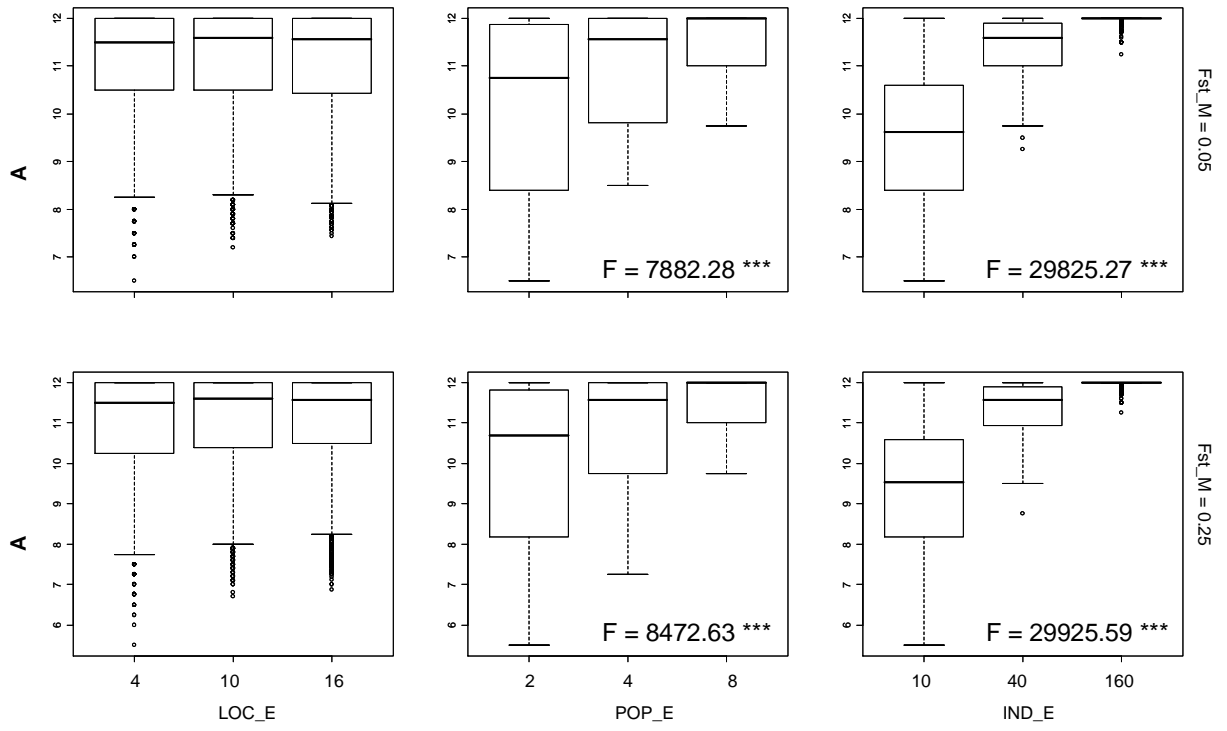


Figure 5b

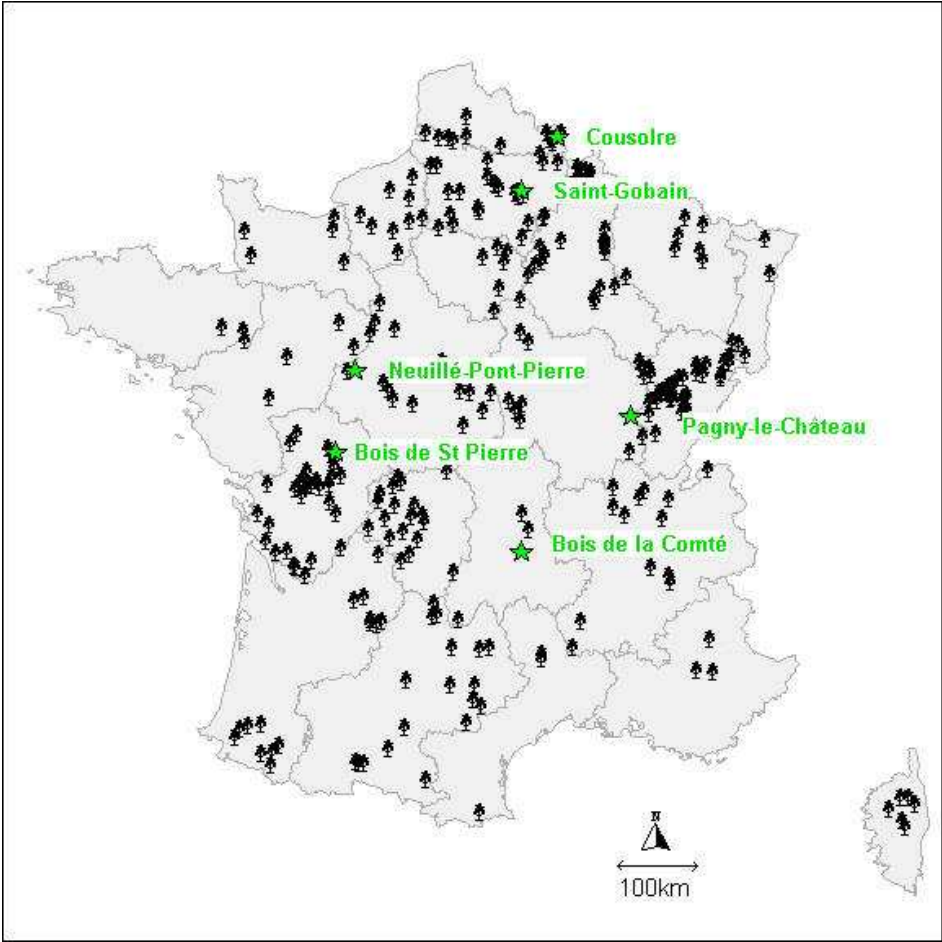


Figure 6

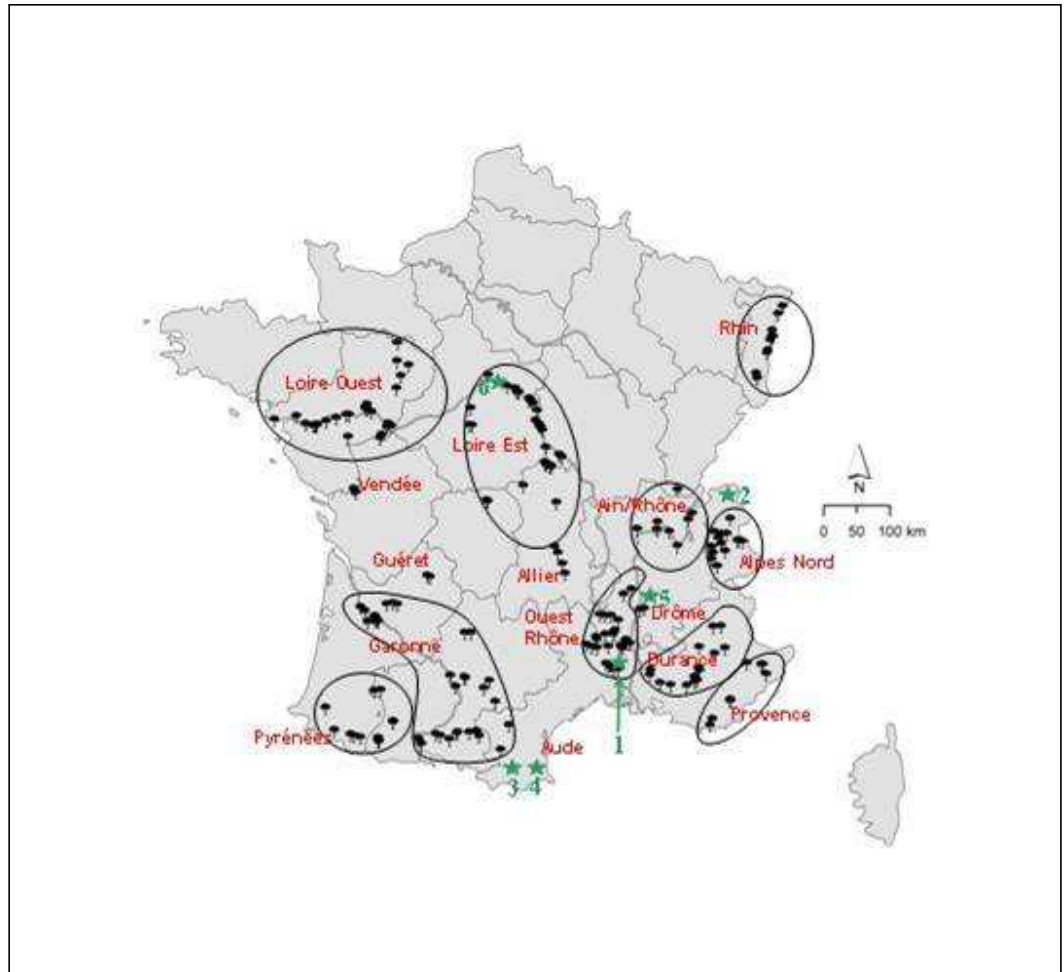


Figure 7

Annexe 5

**Parental participation in progeny and effective population sizes in
experimental seed orchards of an insect-pollinated tree species, the wild
cherry *Prunus avium* L. (Batsch)**

S Mariette^{1,2,3,*}, E Balsemin^{1,2,*}, S Stoeckel^{1,2}, M Tavaud⁴, H le Bouler⁵, F Santi⁶, M Verger⁶

¹*Cemagref*, Unité de Recherches «Ecosystèmes Forestiers», Domaine des Barres, 45290 Nogent-sur-Vernisson, France.

²Université Paris XI, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, Bât. 360, 91405 Orsay, France.

³INIA, Unit of Forest Genetics, Center of Forest Research (CIFOR-INIA), Carretera de la Coruña Km 7.5, 28040 Madrid, Spain.

⁴Laboratoire Science du Végétal, Agrocampus, CS84215, 65 rue de St Briec, 35042 Rennes, France.

⁵Pépinière Expérimentale, Route de Redon, 44290 Guémené-Penfao, France.

⁶INRA, Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Avenue de la Pomme de Pin, 45166 Olivet, France.

*New address : INRA UREFV, 71 avenue Edouard Bourlaux, B.P.81- 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

Correspondence : Stéphanie Mariette, INRA UREFV, 71 avenue Edouard Bourlaux, B.P.81 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France. E-mail : smariett@bordeaux.inra.fr

Stéphanie Mariette and Emilie Balsemin equally contributed to this work.

Key words: seed orchards, diversity, effective population size, parental participation, human impact, *Prunus avium* L.

Introduction

In Europe, wood exploitation and tree cultivation have modified forest ecosystems for centuries. Human beings have acted upon forest tree species by modifying the demography of populations and the spreading of forest trees through silviculture, and changing the local biodiversity, both at the intra and interspecific levels. Foresters have introduced new genetic materials, that were not always adapted to the new environment. For example, the maritime pines from Portuguese origin that were introduced in the French Landes area proved to be frost-sensitive (Boisseaux, 1986). Tree improvement began in the 19th century. Breeding was started on several species (*Pinus* sp., *Picea* sp., *Populus* sp. and others), that has led to production and spreading of improved genetic material in the ecosystems. In a review on human impacts on forest genetic resources, Lefèvre (2004) suggested to extend the concept of domestication to all genetic modifications caused to forest tree spontaneous populations by human activities, including: (i) breeding and selection, (ii) seed transfer, (iii) plant populations activities, (iv) alteration of the environment. Focussing on seed transfer, Lefèvre (2004) underline that the consequences of the introduction of material on a given population depend on the level of genetic diversity, the destination environment and the local population size. He predicts that the introduction of a lowly diversified, and not well adapted, material is bound to affect negatively the native material, whereas the introduction of a highly diversified, and well-adapted, material can locally increase the levels of genetic diversity, and adaptation. The effects, positive or negative, on native material are expected higher if local population densities are low.

Wild cherry (*Prunus avium* L.) represents an interesting model for the study of the impact of seed transfer on a forest tree species. Foresters began to use wild cherry for reforestation and afforestation in the 1970's, using material from unknown origin. Crave (1987) suggested that this material originated not only from wild cherry but also from sweet cherry or even from

sour cherry (*Prunus cerasus* L., the crossing between *Prunus avium* L. and *Prunus fruticosa* Pall.). In order to provide French foresters with adapted and identified material, a breeding programme, based on the phenotypic selection of some 400 “plus” trees in French forests (Santi, 1988), was initiated by the National Institute of Agronomical Research (INRA). Further testing of these “plus” trees in clonal plantations has led to the selection of eight clones based on their multisite adaptation, growth, form, resistance to disease. Apart from these clones, plantations are also made with plants grown from material collected in seed stands. In order to diversify the genetic material used in plantations, seed orchards are planted. Nevertheless, seed orchards can only be truly considered a better option than other material if their genetic base is large, and if the crossings in the seed orchard are effective, i.e. if the crossings occurring in reality are not very different from an ideal situation in which all clones contribute equally to the seed crop. Several studies of flowering in coniferous seed orchards have shown that this equal contribution of clones is unrealistic, mainly due to among-individual variation in fecundity and phenology (Gömöry *et al*, 2003). *Prunus avium* is an outcrossing, insect-pollinated species, characterized by a gametophytic incompatibility system (Wiersma *et al*, 2001; Sonneveld *et al*, 2001; Sonneveld *et al*, 2003). Few studies on forest seed orchards have concerned animal-pollinated species so far. The effective number of males that mate with each female was found to be large in a study of a *Eucalyptus regnans* seed orchard using the neighbourhood model (Burczyk *et al*, 2002). Chaix *et al* (2003) also concluded that “panmixia-like pollination” could be assumed in a *Eucalyptus grandis* seed orchard. However, more studies are necessary to compare gene flow between insect-pollinated species and wind-pollinated species in seed orchards.

The effective population number or status number (Kjær and Wellendorf, 1997 ; Lindgren and Mullin, 1998) is often used to assess the levels of genetic diversity and relatedness in seed orchards. However, this number is generally assessed in conifer species based on seed and

pollen cones, assuming that they are an indication of gamete contribution (Kang and El-Kassaby, 2002). Experimental comparisons among different assessments of effective population numbers are needed to test if this assumption can affect the estimators.

In order to characterize parental contributions to the orchard seed crop, we analysed diversity, pollen flow among clones and seed production in three different seed orchards of *P. avium*.

More precisely, our work aims at investigating two groups of questions:

- 1- Do flower production, co-flowering time and distance among clones influence effective pollination? Is there panmixia-like pollination in seed orchards of *Prunus avium*?
- 2- Can genetic paternity analysis improve the effective population size estimates provided by flower production, co-flowering time, and seed production assessment?
What phenological and genetic indicators should be used to assess the effectiveness of gene flow in seed orchards?

Material and Methods

Seed orchards composition

The seed orchards analysed in this study were established at the experimental nursery of Guémené-Penfao (France). Three different experimental seed orchards were created in spring 2000. Two of them were installed inside greenhouses: (1) the first one with a simultaneous introduction of whole plants and (2) the second one with a delayed introduction of half of the individuals, the latest clones being installed before the earliest ones with the aim of increasing the co-flowering period among clones. The third orchard was installed outdoors, covered with a net to avoid the pillaging of cherries by birds. The two indoors orchards comprised the same 15 clones each, while the outdoors one comprised only 12 (all present in the orchards indoors). All clones were present twice in seed orchards #1 and #2. Ramets of clones were randomly distributed in each seed orchard. Clones were chosen from the *Prunus avium* breeding population created by INRA.

Phenology, flowering and fruiting measures

For each individual ramet, the following measures were assessed in 2001: flowering start date (first flower), end of flowering date, number of floral clumps (as a measure of flowering intensity), and number of produced seeds. Flowering was measured every day. All seeds were counted before they started falling.

Diversity and paternity analysis

1-Genotyping of orchard clones and progenies

All the parents and approximately 20 seeds per ramet were analysed with the same six microsatellites. Seeds were sampled on trees in 2001. Pits were extracted from fruits and broken to get almonds. The samples were then soaked in distilled water overnight and were dissected to extract the cotyledons and embryo (offspring tissue) from the endocarp (maternal tissue). Four microsatellite markers used in this study were initially developed in peach, and

transferred to *P. avium* (Tavaud, unpublished results): UDP96001, UDP96005, PSCHGMS1 and BPPCT034. Other markers were identified in sour cherry (PCEGA34) or sweet cherry (PS12A02). Primers used in this study are given in Table 1. DNA from leaves and from cotyledons plus embryo was extracted using the DNeasy 96 Plant Kit Qiagen method. Amplification reactions were performed using 2 µl of DNA (not diluted after the extraction), 0.2 µM of each primer: F (forward) and R (reverse), 0.1 mM of each dNTP, 1X buffer, 1.5mM of MgCl₂ and 0.6 U of Taq DNA polymerase. A portion of each F primer (depending on the marker) contained fluorescence which was detected by the multiple capillary genetic analyser (ABI PRISM® 3100). The *Genescan 3.7*© software was used to genotype all the individuals.

All the parents of the seed orchards were also analysed for the gametophytic incompatibility system as described by Sonneveld *et al* (2003) with the two pairs of primers PaConsI and PaConsII, with minor modification as followed: the PCR products were analyzed on silver staining gels running for 4 hours and a half. Revelation of gels was made using the protocol described by Streiff *et al* (1998).

2-Diversity and paternity analysis

Classical population genetics parameters were calculated on parents and progenies: number of alleles (A), observed heterozygosity (H_O) and expected heterozygosity (H_E). The genotypes of candidate fathers were compared against the offspring's genotype, and were excluded as fathers if a mismatch occurred at one or more loci. The *Cervus 2.0*© software (Marshall *et al* 1998) was used to make the analysis. Note that, for the two seed orchards in greenhouses, this analysis provided the identity of the clone but not of the ramet.

3-Analysis of factors influencing effective pollination

We made multiple linear regression analysis to detect the influences of the flower production displayed by the mother (F_m), the flower production of each father (F_f), the coflowering

period among clones i and j (CF_{ij}), and the distance among clones (D_{ij}) on the pollination among clones i and j (P_{ij}). We used a stepwise variable selection procedures to identify the best predictors of effective pollination. Non significant score values were excluded from the model by stepwise method.

$$P_{ij} = a + \beta_1.CF_{ij} + \beta_2.D_{ij} + \beta_3.F_m + \beta_4.F_f + \varepsilon$$

where a is a constant term, β_i the regression coefficient of score values of the i^{th} parameter explored and ε the error term of the model.

Definition of male and female gametic contributions according to available information

We defined GC_{ij} as the relative gamete contribution of the [i th male - j th female] ramet pair to the total seed crop, m_i and m_j as the relative male gametic contribution of the i th ramet and the J th clone, respectively, and f_i and f_j as the relative female gametic contribution of the i th ramet and the J th clone, respectively. Note that $GC_{ii}=0$ since *P. avium* is a self-incompatible species.

We used alternative estimators for GC_{ij} , m_i , m_j , f_i and f_j , each of them defined to incorporate the different levels of information that may be available in practice at seed orchards: (1) measurements of flower production by counting floral clumps, (2) measurements of flower production by counting of floral clumps plus the estimation of co-flowering time, (3) a direct estimation of gametic contribution through the counting of seeds for the female contribution and the estimation of male success thanks to the paternity analysis for the male contribution. We wanted to evaluate the relative utility of each kind of measurement to estimate the effective parental size in seed orchards, providing useful criteria to optimise seed orchards management.

For each clone, m_i was obtained summing m_i on ramets of the J th clone (except in the case of the estimation of male success through the paternity analysis for which only m_i can be obtained) and f_j was obtained summing f_j on ramets of the J th clone.

Male gametic contribution: assuming the information we have is:

1- the estimation of flower productions:

$$GC_{ij1} = \frac{PO_j}{\sum_i \sum_j PO_j} \text{ and } m_{i1} = \sum_j GC_{ij1}$$

with P_i being the relative contribution of flower clumps of the i th ramet and O_j being the relative contribution of flower clumps of the j th ramet.

2- the estimation of flower productions plus the estimation of co-flowering periods:

$$GC_{ij2} = \frac{PO_j CF_{ij}}{\sum_i \sum_j PO_j CF_{ij}} \text{ and } m_{i2} = \sum_j GC_{ij2}$$

with CF_{ij} being the length of the co-flowering time between the i th ramet and the j th ramet.

3- the proportion of the I th father having sired the J th mother, available from the paternity analysis.

Based on the unambiguous results from the paternity analysis, i.e. based on the seedlings for which only one father was found in the seed orchard, we calculated the proportion of times that the I th clone pollinated by the J th female, that we called EP_{IJ} . This proportion is relative to the total number of seeds analysed in the paternity analysis if we assume that the number of seeds is not known.

The male gametic contribution of the I th clone was then assessed as $m_{I3} = \sum_j EP_{IJ}$.

It was also calculated relatively to the total number of seed of the seed crop when it is known.

The male gametic contribution of the I th clone was then assessed as $m_{I3tot} = \sum_j EP_{IJ}$.

Female gametic contribution: assuming the information we have is:

1- the estimation of flower productions

With only the number of floral clumps as information, the simpler assumption is that all the ovules are transformed into seeds. In this first case, we assume that only pollen represents a limitation and we assume that all the flowers give a seed which simply means: $f_{j1}=O_j$.

2- the estimation of flower productions plus the estimation of co-flowering periods:

$$f_{j2} = \sum_i GC_{ij2}$$

3- the seed crop per tree and the the total seed crop:

With the number of seeds as information, the total female gametic contribution of the j th ramet is f_{j3} , which is simply the proportion of seeds from the j th ramet in the seed production.

Effective population sizes in seed orchards

1- Based on the paternity analysis, we calculated in each seed orchard the effective number of fathers per mother tree:

$$N_{emj} = \frac{1}{\sum_i EP_{ij}^2}$$

Based on the different estimations of m_i and f_j , we calculated in each seed orchard:

2- the effective paternal size at the level of the seed orchard as:

$$N_{em} = \frac{1}{\sum_i m_i^2}$$

3- the effective maternal size at the level of the seed orchard as:

$$N_{ef} = \frac{1}{\sum_j f_j^2}$$

4- the effective size of the parental population at the level of the seed orchard as:

$$N_{ep} = \frac{1}{\sum_P r_P^2}$$

where r_p is the average gametic contribution of the P th parental individual ($r_p = \frac{m_p + f_p}{2}$). For this estimation, we used seven different combinations of the estimations of m_i and f_j (see Table 2).

We neglected pollen contamination to make all these calculations.

Results

Parents and progenies showed similar levels of genetic diversity, and new alleles were detected in the progenies

PCR products with the PCHGMS1 marker revealed two segregating locus (PCHGMS1-1 and PCHGMS1-2) that were included in the analyses.

Results of the genetic analysis of parents and progenies are given in Table 3.

The seven loci showed average H_O and H_E respectively of 0.681 and 0.716 for the 15 clones in orchards #1 and #2, and 0.679 and 0.719 for the 12 clones in orchard #3. These values were not significantly different from the values calculated for progenies: H_O and H_E were 0.682 and 0.680 for the progenies of orchard #1, 0.707 and 0.688 for progenies of orchard #2, and finally 0.692 and 0.666 for progenies of orchard #3.

The average allelic richness A was 6.14 for the 15 clones present in seed orchards #1 and #2 (5.71 for the 12 clones available in orchard #3). This value increased when considering progenies. The average allelic richness A was 7.57 for the 495 progenies analysed in the first orchard. In comparison with the clones, one more allele was found for UDP96001, for PCEGA34 and BPPCT034, and three more alleles for UDP96005. A was 6.57 for the 491 individuals analysed in the second orchard. In comparison with the clones, one more allele was found for PS12A02, and two more alleles for UDP96005 (also detected in orchard #1). A was 6.43 for the 190 individuals analysed in the third orchard. In comparison with the clones in the seed orchard, one allele was lost for UDP96001, PCHGMS1-1 and PCHGMS1-2, one more allele was found for PS12A02, PCHGMS1-1 and two more alleles were found for PCHGMS1-2, PCEGA34 and BPPCT034.

Reduced level of pollen contamination in greenhouse seed-orchards, and significant effects of the co-flowering time and of the distance among clones on effective pollination were detected

The total exclusionary power for the second parent was 0.9929 in the first and second seed orchard (15 clones) and 0.9916 in the third one (12 clones).

Summarized results of the paternity analysis are given in Table 4. For the three seed orchards, one father could be found in the clones of the orchards for more than 70% of the analysed seedlings, and more than one father was detected for about 2% of the seedlings. The percentage of seedlings for which no father was found in the clones of the seed orchard reached 16.8% in the third one (outside one), being 8.5% in the first one and 12% in the second one. In the first orchard, 5 (11.9%) out of the 42 seedlings for which no father was found showed at least one new allele (4 at one locus and 1 at two locus). In the second orchard, a similar result was found, i.e. 5 (8.5%) out of the 59 seedlings showed one new allele at one locus. However, in the third one, 18 (56%) out of the 32 seedlings for which no father was found showed one new allele at one or more locus (17 at one and 1 at two locus). Besides, negative correlations were detected between the number of seedlings for which no father was found and the mean co-flowering time of clones in orchards #1 and #2. More particularly the clone showing the highest number of seedlings with no detected father (respectively 12 and 14 out of 42 and 59 seedlings in orchards #1 and #2, the clone was not present in orchard #3) showed the lowest co-flowering time with other clones in the seed orchards.

In the three seed orchards, we detected a significant effect ($p < 0.01$) of the co-flowering period (positive relationship) and of the distance among clones (negative relationship), except in the third seed orchard for which the influence of the distance was not found significant and for which the coflowering was only significant at the 5% level. The production of flowers was found significant at the 5% level in the seed orchard #2 but not in the two others.

As revealed by the regression analyses, 16,3% of variation in effective pollination in the three orchards could be explain by the distance between parents and the parental coflowering time

($F_{2,357}=34,874$, $p<10^{-5}$). Regression coefficients (β_i) show a negative correlation between distance among trees and effective pollination ($\beta_D=-0.257$, $t_{357}=-5.057$, $p<10^{-6}$) and a positive correlation between parental coflowering time and effective pollination ($\beta_{CF}=0.245$, $t_{357}=4.82$, $p<10^{-5}$). However, the stepwise multiple linear regression analysis reports no correlation between male/female blossoms and effective correlation.

The quite low number of effective size of fathers per mother contrasts with high effective sizes of mothers, fathers and parents at the level of the seed orchard

Summarized data of effective sizes of fathers per mother are given in Table 5. In the seed orchard #1, the number of observed crossings among trees were 34% of all the possible crossings, and the effective size of fathers per mother varied between 1 (6.7% of the total size of the seed orchard) and 6.8 (45.3%), the mean value being 3.7 (24.7%) and the standard deviation being 1.5. In the seed orchard #2, the number of observed crossings were 33% of all the possible crossings, and the size varied between 1.4 (9.3%) and 6.4 (42.7%), the mean value being 3.4 (22.7%) and the standard deviation being 1.4. In the seed orchard #3, the number of observed crossings were 49% of all the possible crossings, the size varied between 2.5 (20.8%) and 4.6 (38.3%) in the seed orchard #2, the mean value being 4.4 (36,7%) and the standard deviation being 0.9.

Effective sizes of mothers and fathers, based on different levels of information, are given in Table 6.

For the female function, considering the information provided by co-flowering time on top of the number of flowers led to observe an increase of the effective size of 0.4 for seed orchard #2 and a decrease of 0.7 for seed orchard#3. The two estimations were the same for seed orchard#1. Considering the number of seeds harvested for each ramet instead of the number of flowers led to an observation of a reduction in the effective size of 1.2 and 1 respectively in seed orchard #1 and #3 and the effective size remained stable in seed orchard #2.

For the male function, considering the information provided by co-flowering time on top of the number of flowers led to observe a diminution of the effective size of 0.5, 0.1 and 1.3 respectively in seed orchards #1, #2 and #3. Considering the pollination success obtained with the paternity analysis instead of the number of flowers led to observe a diminution of the effective size of 1.5, 1.5 and 1.2 respectively in seed orchard #1, #2 and #3. Considering the pollination success obtained with the paternity analysis, calculated based on the seed crop, instead of the number of flowers led to observe a diminution of the effective size of 1.8, 3.6 and 1.4 respectively in seed orchard #1, #2 and #3.

Effective sizes of parents, based on different levels of information, are given in Table 7.

For the seed orchard #1, the effective size varied between 11.4, obtained with counting of flowers for females and males, and 12.3, obtained with counting of flowers for females and paternity test (dans tableau) for males. The value obtained with counting seeds for females and with the paternity analysis for males was 11.5, and only low differences of values were obtained with other estimators. Very similar results were obtained in seed orchard #2, except that the highest values were obtained with the counting of seeds and the counting of flowers, and with the counting of seeds and the counting of flowers plus taking account the coflowering time (12.1).

The results obtained on the seed orchard #3 were different: the lower value was obtained with counting seeds and counting flowers and taking account the coflowering time (7.6) (dans tableau 7.5 pour comptage fleurs et CF?) and the highest value was obtained with counting seeds and counting flowers (10.3). The value obtained with counting seeds for females and with the paternity analysis for males was 8.3 and the closest value was obtained with counting flowers for males and females (8.5).

Discussion

The first aim of this work was to analyse whether significant deviations from panmixia like pollination can be detected in the experimental seed orchards of *P. avium* that we studied. No difference in levels of diversity, measured with observed and expected genetic diversities, were found between the parents of the seed orchards and the progenies. Moreover, at the level of seed orchards, the effective size of fathers, measured by the paternity analysis, was between 7.6 and 10.6, that is to say from 63% to 68% of the sizes of populations. The effective size of mothers was between 7.2 and 10.5, i.e. 60% and 70% of the sizes of populations. The effective size of parents was between 8.5 and 11.9, that are 70% and 80% of the sizes of populations. These results would allow us to conclude that “panmixia-like pollination” occurred in the seed orchards. However, in the present study, the realised crossings were about 30% of the possible crossings in the seed orchards #1 and #2, and reached 49% in the seed orchards #3. These figures ? seem to indicate that the seeds derived from particular crossings among trees. In addition, the estimates of effective sizes at the level of the whole seed orchard contrasted with the average effective size of fathers per mother, that were respectively 24.7%, 22.7% and 36.7% of the total sizes of seed orchards, respectively. We also demonstrated that effective pollination depends significantly on the distance and on the phenological overlap among clones. We also gave evidence that the clonal production of flowers contributed to explain the male success of clones in the seed orchard #2. Therefore, preferential matings occurred among clones that were closed and that have long periods of co-flowering. Finally clones producing more pollen had a higher pollination success inside the seed orchard. If panmixia is defined as random union of gametes within the seed orchard, these results tend to show that the progenies represent only a portion of the possible crossings from the seed orchards and that panmixia is not reached. Deviations from panmixia caused by a difference in the distance between clones, variation in the amounts of pollen produced, and

phenological synchrony between clones have already been suspected or demonstrated in seed orchards to explain pollination patterns (study on *Pinus thunbergii*, Goto *et al* 2002 and study on *Cryptomeria japonica*, Moriguchi *et al* 2004). In a review on pollen flow in forest trees, Smouse and Sork (2004) showed that distance-dependent pollination is more generally expected in forest tree species populations, though large distances events can be observed with a significant proportion. Finally, the effective sizes of fathers per mother that we measured in our study (neglecting pollen contamination) are close to the low values that are expected in animal-pollinated species: generally less than 10 (review by Smouse and Sork, 2004).

The stepwise multiple linear regression exhibits a coefficient of determination ($R^2=0.163$) that could appear at first sight to be low. Nevertheless, the only two parameters, distance and coflowering time, succeed to explain one sixth of the variance in effective pollination. Male and female blossoming were respectively chosen as estimators of the male pollen production and of the female attractiveness of pollen vector. We did not find correlation between male/female blossoms and effective pollination. The proximity between trees and the fact that seed orchards represent high flower density and homogenous patches may conduce pollen vectors to forage at random without taking each global tree attractiveness into account.

The second aim of this work was to compare the information given by phenological and molecular data with the information provided by molecular data to assess effective population size in seed orchards, and assess the quality of gene flow in seed orchards. Genetic diversity and relatedness is often assessed using the concept of effective population number or status number (Kjær and Wellendorf, 1997 ; Lindgren and Mullin, 1998). In coniferous species, the calculation of the effective population number is very generally based on the counting of male and female flowers, assuming implicitly that female and male production of flowers is a good

representative of their gametic contribution (Kang and El-Kassaby, 2002). The effective number of parents that we calculated in this study can be considered equivalent to the status number if the seed orchard parents are non-inbred and unrelated. In the present study, we estimated the effective number of parents calculated using different levels of information: production of flowers, production of flowers and co-flowering time, production of seeds and effective pollination measured through a paternity analysis. Our results showed that, for the whole parent contribution, few differences were found between those estimates of the effective size made respectively with the data of the production of flowers, with the production of flowers and the co-flowering time, and with the effective pollination or seed data. The differences were detected higher when the male or female contribution was considered. Then, in our study, molecular analyses and phenotypical data gave similar information regarding effective population size. Those results are surprising since, in our experimental seed orchards, the production of flowers was not found to be a good predictor of the production of seeds (data not shown). Moreover, the paternity analysis showed that distance and co-flowering time strongly influenced the pattern of effective pollination. However, if those results were confirmed in other species cultivated in seed orchards, using phenological data (production of flowers) could provide a sufficient information to assess effective population numbers in seed orchards.

Finally, one can question the use of the effective population number only to analyse the genetic diversity and relatedness in seed orchards populations. In our study, the effective number of parents represented up to 80% of the total population size. However, according to the paternity analysis made with molecular markers, the calculation of the effective size of fathers per mother showed that few males contributed to the pollination of a given mother. The effective numbers of males, females and parents that are calculated at the level of the whole seed orchard do not reflect this result. Those observations may appear contradictory. In

fact, the effective number of males and females at the level of the seed orchards compare the contribution of each clone to the seed crop, but does not allow us to know if seeds harvested on a given mother results from crossings realised with a limited number of fathers. A high effective number of parents at the level of the seed orchard is not incompatible with high correlated paternity within a mother. This result indicates that there is a clear need to mix seeds harvested on different mothers in a seed orchard to make sure that resulting plantations will not be realised with a limited number of genotypes.

Acknowledgements

We would like to extend our warmest thanks to Marie-Claude Lesage-Descauses for the inestimable help of running microsatellites on the capillary sequencer at INRA Orléans. We thank Bernard Héois, Patrick Baldet and Gwenaël Philippe for correcting an early version of the manuscript. Dušan Gömöry is acknowledged for clarifying some formulas for us. Juan José Robledo-Arnuncio is acknowledged for useful discussion on an early draft of the manuscript. This work was financially supported by the French «Ministère de l’Agriculture, de l’Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales» (Direction de l’Espace Rural et de la Forêt). In Spain, Stéphanie Mariette was supported by the «Ramón y Cajal» program.

References

- Boisseaux T (1986). Influence de l'origine génétique (landaise ou ibérique) des peuplements de Pin maritime sur les dégâts causés par le froid de janvier 1985 au massif forestier aquitain. Mise au point d'un test variétal précoce utilisable pour le contrôle de lots de graines, Mémoire de l'ENITEF. Thesis. Université de Bordeaux.
- Burczyk J, Adams WT, Moran GF, Griffins AR (2002). Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. *Mol Ecol* **11**: 2379-2391.
- Chaix G, Gerber S, Razafimaharo V, Vigneron P, Verhaegen D, Hamon S (2003). Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theor Appl Genet* **107**: 705-712.
- Cipriani G, Lot G, Huang W-G, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999). AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* **99**: 65-72.
- Crave MF (1987). Le groupe de travail merisier-chêne rouge de l'IDF. *Forêt-Entreprise* **46**: 10-28.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arus P, Laigret F (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet* **105**: 127-138.
- Downey SL, Iezzoni AF (2000). Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *J Am Soc Hortic Sci* **125**: 76-80.

- Gömöry D, Bruchanik R, Longauer R (2003). Fertility variation and flowering asynchrony in *Pinus sylvestris*: Consequences for the genetic structure of progeny in seed orchards. *For Ecol Manag* **174**: 117-126.
- Goto S, Miyahara F, Ide Y (2002). Identification of the male parents of half-sib progeny from Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) clonal seed orchard using RAPD markers. *Breeding Science* **52**: 71-77.
- Kang KS, El-Kassaby YA (2002). Considerations of correlated fertility between genders on genetic diversity: the *Pinus densiflora* seed orchard as a model. *Theor Appl Genet* **105**: 1183-1189.
- Kjær ED, Wellendorf H (1997). Variation in flowering and reproductive success in a Danish *Picea abies* (Karst.) seed orchard. *For Genet* **4**: 181-188.
- Lefèvre F (2004). Human impacts on forest genetic resources in the temperate zone: an updated review. *Forest Ecol Manag* **197**: 257-271.
- Lindgren D, Mullin TJ (1998). Relatedness and status number in seed orchard crops. *Can J For Res* **28**: 276-283.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* **7**: 639-655.
- Moriguchi Y, Taira H, Tani N, Tsumura Y (2004). Variation of paternal contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. *Can J For Res* **34**: 1683-1690.
- Santi F (1988). Variabilité génétique intra et interpopulations chez le merisier (*Prunus avium* L.). Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon.
- Smouse P, Sork VL (2004). Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *For Ecol Manag* **197**: 21-38.

Sonneveld T, Robbins TP, Boskovic R, Tobutt KR (2001). Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor Appl Genet* **102**: 1046-1055.

Sonneveld T, Tobutt KR, Robbins TP (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theor Appl Genet* **107**: 1059-1070.

Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD, Beck LE, King GJ, Ryder CD, Rajapakse S, Baird WV, Ballard RE, Abbott AG (2000). Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor Appl Genet* **101**: 421-428.

Streff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner H, Glössl J, Kremer A (1998). Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Assessed with isozymes and microsatellites. *Mol Ecol* **7**: 317-328.

Wiersma PA, Wu Z, Zhou L, Hampson C, Kappel F (2001). Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theor Appl Genet* **102**: 700-708.

Table 1: Name, reference, name of the species for which the marker was developed, primer sequences, and expected PCR product size of the six microsatellites used in this study.

| SSR name | Reference | Species | Primer sequence (5' → 3') | Length (bp) |
|----------|---------------------------------|-------------------------------|---|-------------|
| UDP96001 | Cipriani <i>et al</i> (1999) | Peach <i>P. persica</i> | F : AGTTTGATTTTCTGATGCATCC | 120 |
| | Sosinski <i>et al</i> (2000) | | R : TGCCATAAGGACCGGTATGT | |
| UDP96005 | Cipriani <i>et al</i> (1999) | Peach <i>P. persica</i> | F : GTAACGCTCGCTACCACAAA | 155 |
| | Sosinski <i>et al</i> (2000) | | R : CACCCAGCTCATAACCTCA | |
| PS12A02 | Downey and Iezzoni | Sweet cherry <i>P. avium</i> | F : GCCACCAATGGTTCTTCC | 200 |
| | (2000) | | R : AGCACCAGATGCACCTGA | |
| PCHGMS1 | Sosinski <i>et al</i> (2000) | Peach <i>P. persica</i> | F : GGGTAAATATGCCATTGTGCAATC R : GGATCATTGAACTACGTCAATCCTC | 194 |
| PCEGA34 | Downey and Iezzoni | Sour cherry <i>P. cerasus</i> | F : GAACATGTGGTGTGCTGGTT | 155 |
| | (2000) | | R : TCCACTAGGAGGTGCAAATG | |
| BPPCT034 | Dirlewanger <i>et al</i> (2002) | Peach <i>P. persica</i> | F : CTACCTGAAATAAGCAGAGCCAT R : CAATGGAGAATGGGGTGC | 228 |

Table 2: Calculation of effective populations sizes in the seed orchards according to the available information (CF is for co-flowering time).

| | | Male function | | |
|-----------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | | Flowers | Flowers + CF | Paternity |
| Female function | Flowers | N_{ep11} | - | N_{ep13} |
| | Flowers + CF | - | N_{ep22} | N_{ep23} |
| | Seeds | N_{ep31} | N_{ep32} | N_{ep33} |
| | | | | $N_{ep33tot}$ |

Table 3: Genetic composition of the parents and progenies in the seed orchards.

| | Parents | | | Progenies | | | Progenies | | | Parents | | | Progenies | | |
|-----------|------------------|----------------------|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|
| | Orchards 1 and 2 | | | Orchard 1 | | | Orchard 2 | | | Orchard 3 | | | Orchard 3 | | |
| | <i>A</i> | <i>H_o</i> | <i>H_E</i> | <i>A</i> | <i>H_o</i> | <i>H_E</i> | <i>A</i> | <i>H_o</i> | <i>H_E</i> | <i>A</i> | <i>H_o</i> | <i>H_E</i> | <i>A</i> | <i>H_o</i> | <i>H_E</i> |
| UDP96001 | 4 | 0.533 | 0.609 | 5 | 0.523 | 0.572 | 4 | 0.605 | 0.561 | 4 | 0.583 | 0.627 | 3 | 0.497 | 0.540 |
| UDP96005 | 5 | 0.467 | 0.766 | 8 | 0.661 | 0.761 | 7 | 0.704 | 0.769 | 5 | 0.500 | 0.750 | 5 | 0.790 | 0.751 |
| PS12A02 | 8 | 0.800 | 0.782 | 8 | 0.738 | 0.731 | 9 | 0.782 | 0.752 | 6 | 0.750 | 0.757 | 7 | 0.737 | 0.736 |
| PCHGMS1-1 | 6 | 0.733 | 0.708 | 6 | 0.681 | 0.632 | 6 | 0.706 | 0.664 | 6 | 0.750 | 0.717 | 6 | 0.711 | 0.642 |
| PCHGMS1-2 | 4 | 0.400 | 0.444 | 4 | 0.468 | 0.430 | 4 | 0.425 | 0.417 | 4 | 0.417 | 0.482 | 5 | 0.413 | 0.381 |
| PCEGA34 | 9 | 0.933 | 0.892 | 10 | 0.898 | 0.842 | 9 | 0.874 | 0.844 | 9 | 0.917 | 0.895 | 11 | 0.880 | 0.827 |
| BPPCT034 | 7 | 0.867 | 0.811 | 8 | 0.807 | 0.792 | 7 | 0.850 | 0.808 | 6 | 0.833 | 0.804 | 8 | 0.817 | 0.787 |
| Mean | 6.14 | 0.681 | 0.716 | 7.00 | 0.682 | 0.680 | 6.57 | 0.707 | 0.688 | 5.71 | 0.679 | 0.719 | 6.43 | 0.692 | 0.666 |

Table 4: Summarized results of the paternity analysis.

| | Seed orchard #1 | Seed orchard #2 | Seed orchard #3 |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Progenies | 495 | 491 | 190 |
| One father identified | 365 (73.7%) | 362 (73.8%) | 137 (72.1%) |
| More than one father | 9 (1.8%) | 10 (2%) | 3 (1.6%) |
| No father | 42 (8.5%) | 59 (12%) | 33 (16.8%) |
| Genotyping problem | 79 (16%) | 60 (12.2%) | 17 (9.5%) |

Table 5: Effective sizes of fathers per mother in the three seed orchards.

| | Seed orchard #1 | Seed orchard #2 | Seed orchard #3 |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Lower observed effective size | 1 | 1.4 | 2.5 |
| Higher observed effective size | 6.8 | 6.4 | 4.6 |
| Mean effective size | 3.7 | 3.4 | 4.4 |
| (standard deviation) | (1.5) | (1.4) | (0.9) |

Table 6: Effective sizes of mothers and fathers in the seed orchards.

| | Female function | | | Male function | | | |
|------------|-----------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|-----------------|
| | Flowers | Flowers + CF | Seeds | Flowers | Flowers + CF | Paternity | Paternity+Seeds |
| | N_{ef1} | N_{ef2} | N_{ef3} | N_{em1} | N_{em2} | N_{em3} | N_{em3tot} |
| Seed | 11.2 | 11.2 | 10 | 11.7 | 11.2 | 10.2 | 9.9 |
| orchard #1 | | | | | | | |
| Seed | 10.2 | 10.6 | 10.5 | 10.7 | 10.6 | 9.2 | 7.1 |
| orchard #2 | | | | | | | |
| Seed | 8.2 | 7.5 | 7.2 | 8.8 | 7.5 | 7.6 | 7.4 |
| orchard #3 | | | | | | | |

Table 7: Effective sizes of parents in the seed orchards

| Information on female contribution | Information on male contribution | Effective size | Seed orchard #1 | Seed orchard #2 | Seed orchard #3 |
|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Flowers | Flowers | N_{ep11} | 11.4 | 10.5 | 8.5 |
| Flowers | Paternity | N_{ep13} | 12.3 | 11 | 9.1 |
| Flowers + CF | Flowers + CF | N_{ep22} | 11.2 | 10.6 | 7.5 |
| Flowers + CF | Paternity | N_{ep23} | 12.1 | 11.1 | 8.4 |
| Seeds | Flowers | N_{ep31} | 12.1 | 12.1 | 10.3 |
| Seeds | Flowers + CF | N_{ep32} | 11.8 | 12.1 | 7.6 |
| Seeds | Paternity | N_{ep33} | 11.9 | 11.9 | 8.5 |
| Seeds | Paternity + Seeds | $N_{ep33tot}$ | 11.5 | 11.3 | 8.3 |

Annexe 6

Population structure causes unequal allelic frequencies at the self-incompatibility locus within populations of *Prunus avium*.

Solenn Stoeckel, Vincent Castric, Stéphanie Mariette, Xavier Vekemans

Figures et table des résultats d'un manuscrit en préparation.

Table 1: Results from numerical simulations of a self-incompatibility locus (S-locus) and an unlinked neutral locus under different levels of migration. Simulations with 20 demes of 150 individuals, mutation rates = $5 \cdot 10^{-7}$ and $2 \cdot 10^{-4}$, respectively for the S-locus and the unlinked neutral locus.

| Nm | S-locus | | | | | Unlinked neutral locus | | | | |
|------------------------|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------------|---------------------------|---------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | total population n_a^1 | H_e^2 | deme n_a | H_e | F_{ST} | total population n_a | H_e | deme n_a | H_e | F_{ST} |
| 0.01 | 24.53 ± 2.46 | 0.947 ± 0.005 | 8.73 ± 0.20 | 0.874 ± 0.003 | 0.0821 ± 0.0026 | 32.69 ± 4.03 | 0.943 ± 0.009 | 2.00 ± 0.21 | 0.140 ± 0.042 | 0.8983 ± 0.0071 |
| 0.1 | 21.36 ± 1.64 | 0.947 ± 0.003 | 11.44 ± 0.28 | 0.895 ± 0.002 | 0.0580 ± 0.0016 | 27.81 ± 4.58 | 0.852 ± 0.055 | 4.83 ± 0.54 | 0.542 ± 0.050 | 0.3820 ± 0.0074 |
| 0.5 | 23.24 ± 1.55 | 0.953 ± 0.003 | 15.54 ± 0.47 | 0.913 ± 0.002 | 0.0438 ± 0.0010 | 21.70 ± 4.19 | 0.781 ± 0.088 | 5.76 ± 0.94 | 0.545 ± 0.069 | 0.3195 ± 0.0067 |
| 1 | 24.4 ± 1.46 | 0.955 ± 0.002 | 18.11 ± 0.54 | 0.921 ± 0.002 | 0.0374 ± 0.0008 [0.0327;0.0418] | 21.2 ± 4.46 | 0.748 ± 0.113 | 6.73 ± 1.40 | 0.611 ± 0.093 | 0.1935 ± 0.0041 |
| 3 | 26.56 ± 1.33 | 0.960 ± 0.002 | 23.06 ± 0.78 | 0.935 ± 0.002 | 0.0253 ± 0.0004 [0.0226;0.0298] | 20.54 ± 4.11 | 0.723 ± 0.121 | 8.14 ± 1.79 | 0.671 ± 0.112 | 0.0724 ± 0.0018 |
| 5 | 27.43 ± 1.44 | 0.961 ± 0.002 | 25.15 ± 1.00 | 0.941 ± 0.002 | 0.0216 ± 0.0003 [0.0190;0.0241] | 19.88 ± 4.27 | 0.705 ± 0.135 | 8.88 ± 2.09 | 0.673 ± 0.129 | 0.0477 ± 0.0012 |
| 10 | 28.10 ± 1.32 | 0.962 ± 0.002 | 27.14 ± 1.11 | 0.948 ± 0.002 | 0.0152 ± 0.0002 [0.0134;0.0172] | 19.80 ± 4.20 | 0.703 ± 0.146 | 9.84 ± 2.21 | 0.686 ± 0.143 | 0.0250 ± 0.0006 |
| 20 | 28.51 ± 1.43 | 0.963 ± 0.002 | 28.15 ± 1.31 | 0.954 ± 0.002 | 0.0099 ± 0.0001 | 19.57 ± 4.03 | 0.707 ± 0.136 | 10.46 ± 2.38 | 0.698 ± 0.134 | 0.0131 ± 0.0003 |
| 50 | 28.61 ± 1.31 | 0.963 ± 0.002 | 28.51 ± 1.27 | 0.958 ± 0.002 | 0.0052 ± 0.0001 | 19.73 ± 3.99 | 0.712 ± 0.124 | 11.50 ± 2.59 | 0.708 ± 0.124 | 0.0060 ± 0.0002 |
| Obs³ | n.a. | n.a. | 18 | 0.918 | 0.023 | n.a. | n.a. | 8.29 ± 3.90 | 0.689 ± 0.111 | 0.074 |

¹ Number of alleles, means are given ± standard deviation.

² Heterozygosity expected under panmixia (gene diversity), means are given ± standard deviation over 500 replicates.

³ Observed values are given for the St.Gobain population. Unlinked neutral loci considered are UDP96-005, BPPCT034, PCEGA34, UDP98-411, BPPCT040, PS12A02, UDP98-021.

Figure 2: Distribution of S allele frequencies in the whole population

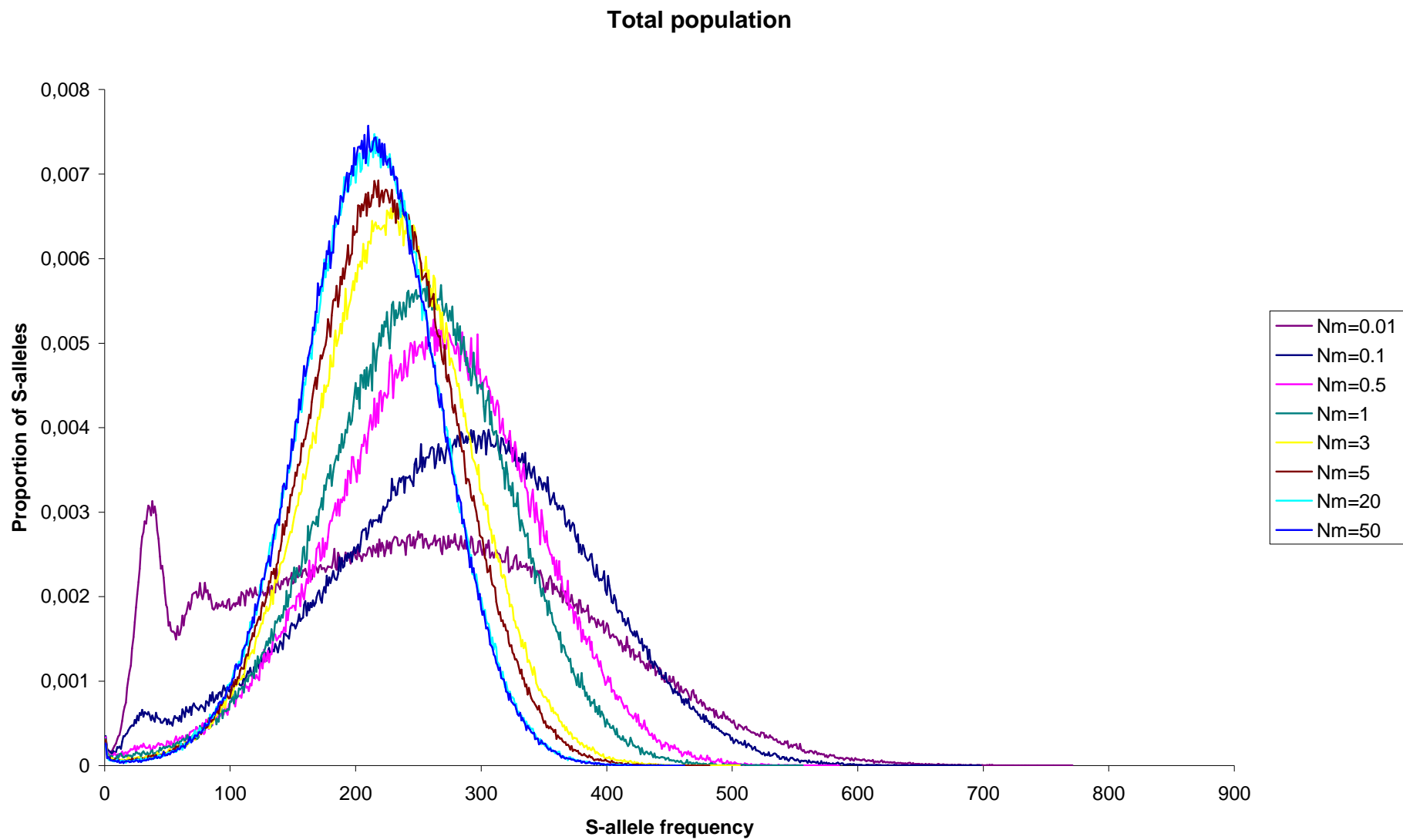
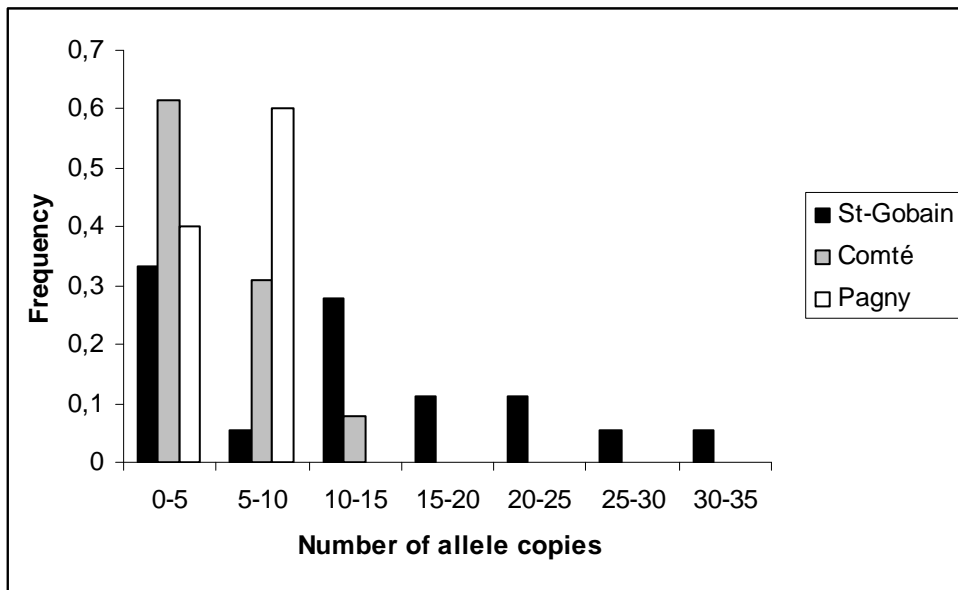


Figure 3: Distribution of S-locus allele frequencies in the three populations



Annexe 7

F_{ST} par allèles

1. Calcul des différenciations

Réalisé avec le logiciel Fstat, nous retenons la valeur du Theta de Weir et Cockerham et les valeurs du G_{st} et du G_{st'} de Nei.

2. Comparaison de la différenciation avec et sans répétitions de génotypes

UDP96-005

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 104 | 0.063 | 0.048 | > |
| 108 | 0.055 | 0.045 | > |
| 114 | 0.004 | 0.001 | > |
| 118 | 0.115 | 0.107 | > |
| 120 | 0.014 | 0.012 | > |
| 126 | 0.116 | 0.103 | > |
| 132 | 0.075 | 0.077 | < |
| 134 | 0.032 | 0.011 | > |
| 138 | 0.137 | 0.174 | < |
| All alleles | 0.066 | 0.055 | > |

→ La différenciation est globalement plus élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Vrai au niveau des allèles sauf pour l'allèle 132 et pour l'allèle 138.

UDP98-021

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 98 | 0.084 | 0.059 | > |
| 100 | 0.081 | 0.112 | < |
| 110 | 0.213 | 0.118 | > |
| 114 | 0.019 | 0.021 | < |
| All alleles | 0.110 | 0.083 | > |

→ La différenciation est plus élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Vrai pour les allèles 98 et 110 mais pas pour les allèles 100 et 114.

BPPCT040

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 120 | 0.035 | 0.088 | < |
| 128 | 0.067 | 0.051 | > |
| 130 | 0.059 | 0.088 | < |
| 134 | 0.067 | 0.134 | < |
| 136 | 0.041 | 0.039 | > |
| 140 | -0.004 | -0.001 | < |
| 142 | 0.131 | 0.131 | = |
| 144 | 0.045 | 0.115 | < |
| All alleles | 0.052 | 0.086 | < |

→ La différenciation est moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Vrai au niveau des allèles sauf pour les allèles 128, et 136. Identique pour l'allèle 142.

PS1A02

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 156 | 0.078 | 0.079 | < |
| 158 | 0.006 | 0.012 | < |
| 160 | 0.163 | 0.220 | < |
| 162 | -0.002 | -0.000 | < |
| 164 | -0.006 | 0.000 | < |
| 166 | 0.045 | 0.028 | > |
| 170 | 0.082 | 0.130 | < |
| 174 | 0.017 | 0.013 | > |
| 178 | 0.160 | 0.154 | > |
| 186 | -0.009 | -0.005 | < |
| All alleles | 0.102 | 0.133 | < |

→ La différenciation est moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Vrai au niveau des allèles sauf pour les allèles 166, 174 et 178.

BPPCT034

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 217 | 0.064 | 0.084 | < |
| 219 | 0.000 | 0.000 | = |
| 221 | 0.142 | 0.099 | > |
| 223 | 0.003 | 0.008 | < |
| 225 | 0.020 | 0.012 | > |
| 227 | 0.017 | 0.014 | > |
| 231 | -0.006 | -0.002 | < |
| 233 | 0.148 | 0.152 | < |
| 239 | 0.009 | 0.014 | < |
| 241 | 0.016 | 0.048 | < |
| 243 | 0.039 | 0.031 | > |
| 255 | -0.007 | 0.010 | < |
| 257 | 0.126 | 0.256 | < |
| 261 | -0.009 | -0.005 | < |
| All alleles | 0.090 | 0.096 | < |

→ La différenciation est moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Vrai au niveau des allèles sauf pour les allèles 221, 225, 227 et 243. Valeur identique pour l'allèle 219.

UDP98-411

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 140 | 0.092 | 0.119 | < |
| 150 | 0.040 | 0.038 | = |
| 158 | 0.009 | 0.008 | = |
| 160 | 0.001 | -0.001 | = |
| 162 | 0.068 | 0.116 | < |
| 164 | 0.015 | 0.057 | < |
| All alleles | 0.052 | 0.076 | < |

→ La différenciation est globalement moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Identique pour les allèles 150, 158 et 160.

PCEGA34

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 123 | 0.015 | 0.016 | < |
| 129 | 0.051 | 0.066 | < |
| 133 | 0.055 | 0.104 | < |
| 135 | 0.123 | 0.172 | < |
| 141 | 0.010 | 0.015 | < |
| 149 | -0.000 | -0.000 | = |
| 151 | 0.018 | 0.036 | < |
| 153 | 0.119 | 0.120 | < |
| 155 | -0.008 | -0.003 | < |
| 157 | -0.009 | -0.006 | < |
| 159 | 0.138 | 0.180 | < |
| 161 | 0.013 | 0.006 | > |
| 163 | 0.022 | 0.014 | > |
| 165 | 0.126 | 0.126 | = |
| 167 | 0.022 | 0.034 | < |
| 169 | 0.022 | 0.014 | > |
| 171 | -0.009 | -0.006 | < |
| 181 | -0.009 | -0.000 | < |
| 183 | -0.009 | -0.004 | < |
| All alleles | 0.057 | 0.072 | < |

→ La différenciation est globalement moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Plus élevée pour les allèles 161, 163 et 169. Identique pour les allèles 149 et 165.

UDP98-412

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|-------------|----------|----------|-------------|
| 86 | 0.082 | 0.106 | < |
| 112 | 0.010 | 0.039 | < |
| 116 | 0.016 | 0.009 | > |
| 118 | 0.010 | 0.014 | < |
| 120 | 0.020 | 0.023 | < |
| 122 | 0.011 | 0.056 | < |
| 124 | -0.009 | -0.005 | < |
| 126 | -0.007 | -0.003 | < |
| All alleles | 0.016 | 0.029 | < |

→ La différenciation est globalement moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Plus élevée pour l'allèle 116.

GSI locus

| Allele | Theta SD | Theta AD | Comparaison |
|--------|----------|----------|-------------|
| 1 | 0.051 | 0.037 | > |

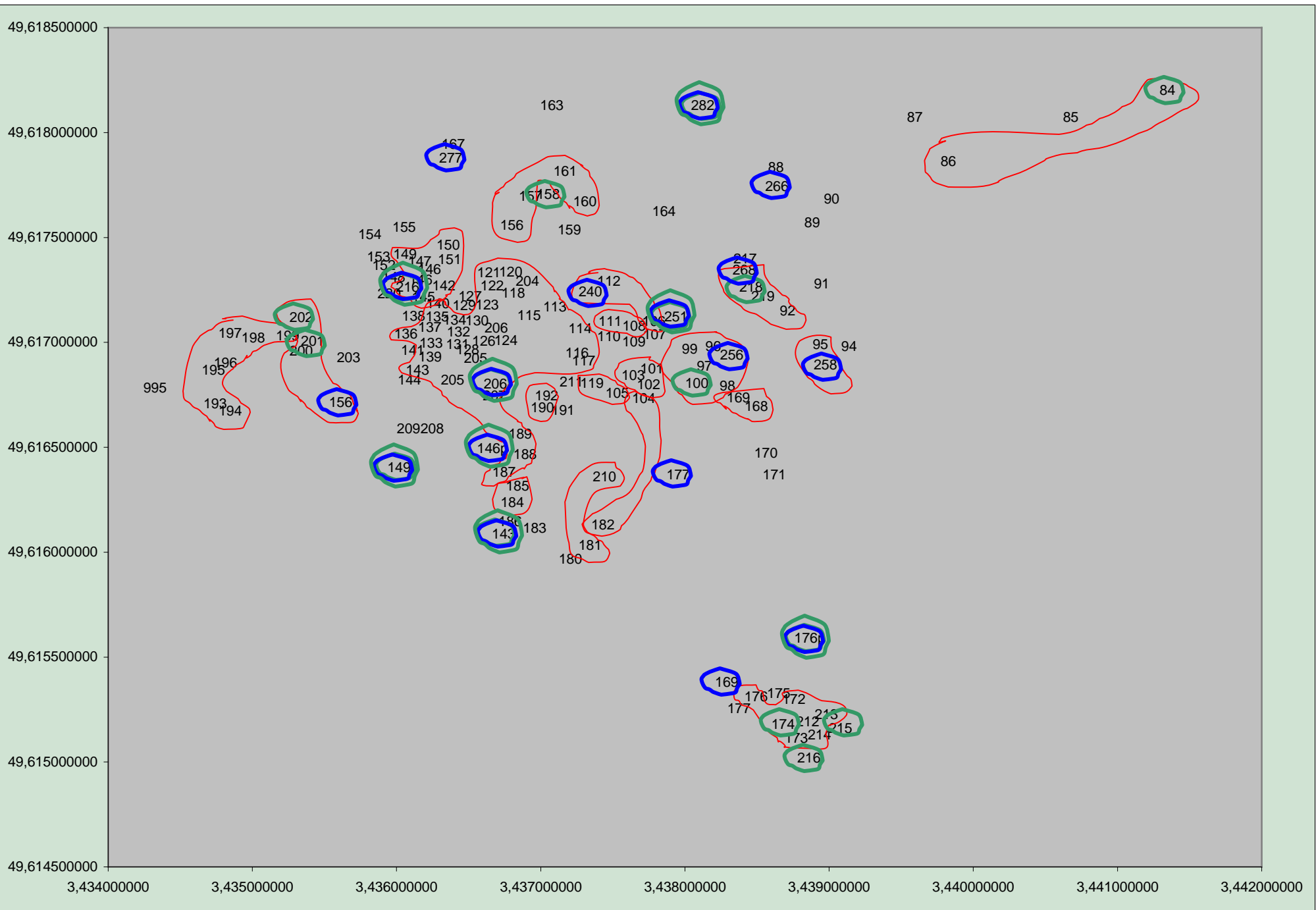
| | | | |
|-------------|--------|--------|---|
| 2 | -0.005 | 0.019 | < |
| 3 | 0.037 | 0.075 | < |
| 4 | -0.009 | -0.005 | < |
| 6 | -0.011 | 0.006 | < |
| 7 | -0.008 | -0.002 | < |
| 9 | -0.009 | -0.005 | < |
| 10 | 0.020 | 0.064 | < |
| 12 | 0.032 | 0.027 | > |
| 13 | 0.023 | 0.017 | > |
| 14 | 0.033 | 0.069 | < |
| 16 | 0.001 | 0.002 | < |
| 17 | 0.030 | 0.051 | < |
| 18 | 0.017 | 0.020 | < |
| 19 | 0.045 | 0.022 | > |
| 20 | 0.055 | 0.093 | < |
| 21 | -0.000 | 0.014 | < |
| 22 | -0.006 | -0.000 | < |
| All alleles | 0.023 | 0.042 | < |

→ La différenciation est globalement moins élevée sans répétition de génotypes qu'avec répétition de génotypes. Plus élevée pour les allèles 1, 12, 13 et 19.

Annexe 8

Plan des arbres échantillonnés de la population de St-Gobain pour l'étude des flux de pollen

Cerclé de bleu, les arbres-mères prélevés pour la récolte de descendants 2002 ; en vert, la récolte de descendants 2003. Les polyèdres rouges regroupent les individus de mêmes génotypes que nous considérerons comme des taches de drageons.



CÉLINE

Dix jours avant la date prévue de ma soutenance de thèse, mon épouse, Céline, est décédée à l'hôpital Bretonneau de Tours suite à des erreurs médicales répétées de la part du SAMU 37 (deux médecins différents) et du docteur Antoine Guimard de SOS médecin. Deux heures avant le décès de Céline, et malgré l'expression répétée de nos inquiétudes concernant le futur enfant que nous attendions, ce dernier médecin diagnostiquait de façon cavalière une gastro-entérite, qu'il précise "aigue" parce "qu'il en avait déjà diagnostiquées trois avant" Céline dans la matinée. En fait, Céline faisait une grossesse extra-utérine ayant entraîné une hémorragie interne, diagnostiquée correctement par des médecins urgentistes 2 heures après la consultation du Dr Guimard, alors que Céline subissait une ultime perte de connaissance avec arrêt cardio-ventilatoire.

Son décès cérébral est déclaré le 6 mai 2006. Céline repose désormais au cimetière de Crézancy-en-Sancerre (18).

Tout ceci s'est passé au XXI^{ème} siècle en France, non parce qu'on ne sait pas traiter ces cas médicaux (11% des grossesses en déclarées en France) mais à cause de la certitude suffisante d'une personne n'ayant pas saisi les fondements de la pensée régissant sa discipline, les Sciences, et/ou qui a voulu économiser un scanner ou une échographie (tout comme le SAMU a préféré, dans un premier temps, éviter le déplacement de matériels et de personnels qualifiés, retardant l'action des secours).



Céline avait choisi de devenir professeur des écoles, d'enseigner et de transmettre dans les endroits où les enfants ont le plus besoin d'être aidés, de recevoir le savoir, la culture et le regard bienveillant d'un adulte. Céline savait leur apporter tout cela, leur donner des points de repères et l'image d'une certaine stabilité dans un monde souvent cruel.

Pour elle, pour moi, j'espère pouvoir contribuer à transmettre cette part essentielle de la philosophie de la Science qui a incontestablement fait défaut à Antoine Guimard : le doute. La remise en question des certitudes cognitives, sensorielles ou *a priori* et l'accumulation d'informations convergentes issues de différentes sources devraient être les réflexes naturels d'un médecin. Nous aurions aimé que cette philosophie, si précieuse pour combattre les dogmatismes obscurs, nous protège de l'incompétence de ces médecins le mercredi 3 et le jeudi 4 mai 2006.

La vie est merveilleuse de complexité, de diversité mais aussi de fragilité dans sa lutte constante contre l'inerte. Je regrette que son respect ne soit pas une notion centrale dans notre



société, mais il semblerait que la prédominance des notions économiques poussent notre système à préférer l'épargne de quelques "richesses" à la sauvegarde de l'un de ses membres. Ces richesses, tel que le fonctionnement d'un scanner ou encore le maintien d'équipes médicales en nombre suffisant pour répondre aux urgences, ne sont pourtant pas un luxe qu'on peut humainement économiser sans en envisager les conséquences. Cette richesse n'a pas de prix et en défendre la dépense, sans attendre qu'un de nos proches en pâtisse, éviterait bien des malheurs.

Enfin, le respect de la vie passe aussi par la connaissance et le respect de la mort. Dans notre société où le perdant (de la vie) est considéré comme un moins que rien, il est douloureux de s'apercevoir que les vécus d'une majorité de personnes reposent souvent sur des œuvres de fiction. La mort n'est ni un spectacle hollywoodien, émouvant, captivant ou

écœurant, ni un processus que nous pouvons ignorer comme s'il avait été éradiqué de notre société. Le décès d'un proche, c'est avant tout des douleurs (évitables et inévitables) qui font partie de la vie, qui lui donnent sa valeur et dont on devrait pouvoir parler sans gêne ni tabou : l'être décédé mérite qu'on parle de lui, non parce qu'il en a besoin, mais parce qu'en parler ou l'évoquer fait revivre le bonheur qu'il procurait à ses survivants.

Dans cet thèse, vous trouverez beaucoup de Céline, d'abord parce qu'elle a participé physiquement à sa création, elle m'a aidé, relu, corrigé, soutenu mais surtout parce qu'après 9 années de partage total, le "je" que je prononce ne trouvait son écho que dans le "nous".

Tout ce que je suis et ce que je fais trouve son inspiration en elle.

Pour moi, elle était ma vie et mon bonheur, pour tous elle était le paradigme de la noblesse, de l'altruisme et de l'empathie. Si aider les autres avait été une Science, Céline aurait un prix Nobel. Si la Justice gouvernait notre monde, Céline en serait la Reine. Les mots me semblent ridicules et inappropriés pour parler de ce qu'elle était et de ce qu'elle dégageait...

Je ne sais qu'ajouter si ce n'est qu'elle manque cruellement à tous ceux qui l'ont connue.



Céline Stoeckel, née Loriol à Palaiseau (91) le 1^{er} janvier 1980, mère de Noam âgé d'un an et une semaine lorsqu'elle est décédée le 6 mai 2006 à cause de l'incompétence et de la suffisance de personnels du corps médical et de la déshumanisation des rapports patients-médecins motivée par des raisons économiques.