



Département Recherches et Développement

Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers

Variabilité génétique au sein des vergers à graines français de Douglas

Coralie JACQUES

Rapport de stage M2 BOPE

Réalisé au Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers (ONF)

2013/2014

USC ONF-INRA Centre de recherche d'Orléans 2163 avenue de la pomme de pin CS 40001

ARDON 45075 ORLEANS Cedex 2

Sous la direction de Brigitte MUSCH

Le Douglas vert, *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco, est une essence candidate de premier intérêt pour la diversification adaptative aux changements climatiques. Les peuplements arrivant à maturité, les gestionnaires s'interrogent sur le mode de régénération : par plantation ou semis naturels ? L'objectif de cette étude était d'évaluer la variabilité génétique présente dans un verger à graines français de Douglas. Pour cela, 29 descendances maternelles et un lot de graines issu d'une récolte commerciale ont été étudiés à l'aide de 11 marqueurs microsatellites nucléaires. Le niveau de fertilité des clones a également été testé. Nos résultats ont montré que ces populations présentaient une diversité génétique importante mais aussi un fort déficit en hétérozygotes. De nouveaux allèles sont apparus chez les descendants. Une contribution paternelle inégale des clones a été mise en évidence. Nos résultats ont également permis de mettre en évidence l'impact de la génétique et de l'environnement sur le niveau de fertilité des clones.

Mots clés : diversité génétique, flux de pollen, marqueurs moléculaires, microsatellites.



Département Recherches et Développement

Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers

Variabilité génétique au sein des vergers à graines français de Douglas

Coralie JACQUES

Rapport de stage M2 BOPE

Réalisé au Conservatoire Génétique des Arbres Forestiers (ONF)

2013/2014

USC ONF-INRA Centre de recherche d'Orléans 2163 avenue de la pomme de pin CS 40001

ARDON 45075 ORLEANS Cedex 2

Sous la direction de Brigitte MUSCH

Le Douglas vert, *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco, est une essence candidate de premier intérêt pour la diversification adaptative aux changements climatiques. Les peuplements arrivant à maturité, les gestionnaires s'interrogent sur le mode de régénération : par plantation ou semis naturels ? L'objectif de cette étude était d'évaluer la variabilité génétique présente dans un verger à graines français de Douglas. Pour cela, 29 descendances maternelles et un lot de graines issu d'une récolte commerciale ont été étudiés à l'aide de 11 marqueurs microsatellites nucléaires. Le niveau de fertilité des clones a également été testé. Nos résultats ont montré que ces populations présentaient une diversité génétique importante mais aussi un fort déficit en hétérozygotes. De nouveaux allèles sont apparus chez les descendants. Une contribution paternelle inégale des clones a été mise en évidence. Nos résultats ont également permis de mettre en évidence l'impact de la génétique et de l'environnement sur le niveau de fertilité des clones.

Mots clés : diversité génétique, flux de pollen, marqueurs moléculaires, microsatellites.

ABSTRACT

Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco is a candidate of primary interest for adaptative diversification to climate change. Stands maturing, forest managers have to choose the regeneration mode: through planting or natural regeneration? The aim of this study was to evaluate the genetic variability of a French Douglas-fir seed orchard. For this, 29 maternal offsprings and a commercial seed lot were studied using 11 nuclear microsatellite markers. The fertility of clones was also tested. Our results showed that these populations had a significant genetic diversity and a strong deficit in heterozygotes. New alleles appeared in the offspring. An unequal paternal contribution of the clones was also demonstrated. Our results also highlight the impact of genetic and environment on clones' fertility.

Key words: genetic diversity, pollen flow, molecular marker, microsatellite

I- INTRODUCTION

Pour l'essentiel issus de boisements par plantations réalisées depuis la création du Fonds Forestier National au début des années 1960 (Angelier et *al.*, 2004), les peuplements de Douglas représentent un peu plus de 400 000 hectares au sein des 14,9 millions d'hectares de la forêt française métropolitaine (source IFN). Ils sont répartis sur 6 régions (Auvergne, Bourgogne, Languedoc-Roussillon, Limousin, Midi-Pyrénées et Rhône-Alpes) majoritairement avec un volume sur pied évalué à près de 100 millions de m³. La production de bois de Douglas, dont l'augmentation a d'ores et déjà été significative au cours des 10 dernières années, se poursuivra tout au long des prochaines décennies, pour atteindre près de 6 millions de m³ en 2030 (<http://www.france-douglas.com/>). L'essentiel des boisements français actuels a un âge moyen compris entre 20 et 40 ans (Angelier 2007). C'est une essence à amplitude biogéographique large qui, dans son aire d'origine nord-américaine, occupe des conditions pédo-climatiques qui recouvrent très largement la gamme de celles présentes et à venir en France. Cette diversité potentielle et la qualité de son bois caractérisé par un fil droit, des accroissements réguliers et soutenus, ainsi que par une proportion élevée de bois de cœur en font une essence candidate de premier intérêt pour la diversification adaptative aux changements climatiques d'autant plus qu'elle peut être cultivée en mélange avec d'autres essences.

Actuellement, de nombreux peuplements arrivent maturité avec une forte dynamique de renouvellement et d'extension des surfaces. Ainsi, contrairement à ce qui est observé toutes essences confondues, les ventes de graines et plants de Douglas sont en forte progression (+26% en 2010-2011) avec une tendance continue à la hausse se traduisant par de fortes récoltes (+243 %, source Ministère de l'agriculture, avril 2012). Dans le cas, fréquent, où le maintien de cette essence est envisagé, se pose alors la question du mode de régénération : par plantation ou par semis naturel (modalité non envisagée à la création initiale de ces peuplements). En effet, de nombreux propriétaires constatent qu'à la suite d'interventions sylvicoles ou de chablis importants, des semis naturels de Douglas s'installent, parfois de manière très dense. De par son introduction à partir de zones géographiques limitées et vraisemblablement d'un faible nombre de semenciers, les peuplements de douglas peuvent présenter une diversité faible et un fort fardeau génétique. La conséquence en terme sylvicole est une forte chute des performances lors de croisements entre apparentés. En effet, un faible effectif de reproducteurs d'un peuplement donné et une base génétique initiale réduite peuvent avoir pour conséquence une diversité génétique limitée des lots de graines récoltées (Valadon 2009). On peut légitimement s'interroger sur la résilience des peuplements en place, la diversité génétique étant un des facteurs de l'adaptation des espèces aux changements climatiques. A contrario, dans le cas d'un renouvellement du peuplement par plantation, le gestionnaire peut s'approvisionner en graines produites au sein de vergers à graines de l'Etat. Les vergers à graines sont conduits sur plusieurs dizaines d'années pour obtenir « une production de graines fréquente, abondante et de récolte aisée » (définition de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique). Les vergers à graines doivent avoir une base génétique large, sélectionnée et pour certains testée afin de produire un bois de qualité avec un gain génétique connu. Ils doivent enfin être suffisamment isolées ou spécialement gérés pour que les pollinisations exogènes soient inexistantes ou faibles et que les croisements se fassent en respectant les règles de panmixie.

Cependant, cette situation est rarement respectée : Burczyk *et al.* (1997) ont montré, en analysant des descendances maternelles à l'aide de marqueurs génétiques neutres, qu'il est courant d'observer que l'ensemble des individus du verger à graines ne participent pas à la création du lot de graines et que les contributions mâles sont variables d'un individu à l'autre. Ainsi, quelques individus contribuent pour une part relativement élevée alors qu'un très grand nombre d'individus contribue très peu (Burczyk *et al* 1997). Cette contribution déséquilibrée

des clones dans le pool de gamètes mâles induit des différences dans les fréquences de gènes du pool gamétique et de celles de la population de ramets du verger.

La diversité et la valeur génétique d'un lot de graines récolté au sein des vergers à graines sont aussi influencées par la contamination pollinique. En effet, ces vergers composés d'espèces anémophiles sont en croisement libre. Le pollen provenant d'individus proches mais non sélectionnés peut féconder les fleurs femelles du verger. Dans ce cas, les semences produites peuvent avoir un gain génétique inférieur à celui espéré. Plusieurs études chez le douglas ont permis la mise au point de marqueurs moléculaires permettant d'estimer le taux de contamination pollinique (Stoehr et al. 1998; Slavov *et al.* 2004). La grande variabilité des marqueurs microsatellites utilisés par Slavov *et al.* (2004) permet d'estimer précisément la contamination pollinique et d'attribuer sans ambiguïté un père pour la grande majorité des graines. Cette étude a aussi mis en évidence que la reproduction entre clones de même classe de phénologie florale a tendance à se produire plus souvent que ce qui est prévu dans l'hypothèse de panmixie. Cette tendance est particulièrement préoccupante pour les clones ayant une phénologie florale extrêmement précoce ou tardive. Erickson *et al.* (1989) ainsi que Burczyk *et al.* (1997) ont étudié le possible lien entre la phénologie florale et le succès reproducteur mâle. Ils ont montré qu'en plus du degré de synchronisation florale, la période relative de floraison des clones est importante dans les échanges de pollen. Ils ont également constaté que le manque général de synchronisation florale complète des proches voisins semble réduire les rencontres préférentielles entre eux.

Toutefois, en verger à graines, l'ampleur de ces variations individuelles peut être fortement atténuée par une répartition spatiale aléatoire des génotypes favorisant le brassage génétique entre composants du verger. De plus, un verger à graines bénéficiant d'une gestion florifère intensive est, comparé à des peuplements naturels porte-graines, plus à même de produire des lots de semences de composition génétique plus homogène d'une année à l'autre (Valadon 2009).

Pour évaluer les gains réalisés en verger à graines, sur les caractères améliorés, des tests d'évaluation ont été mis en place. Ces tests multipartenaires (Irstea, INRA, IDF, ONF) sont actuellement mesurés régulièrement par ceux-ci. Ces partenaires ne possèdent, cependant, aucune donnée sur la diversité neutre alors que celle-ci permettrait d'obtenir des renseignements sur la variabilité génétique sélectionnée. Il est donc nécessaire de compléter

cette information par une analyse de la diversité génétique contenue dans ces vergers à graines.

L'étude, présentée ici, s'inscrit dans ce projet et aborde plus spécifiquement les questions suivantes :

- ❖ Les croisements observés dans le verger se font-ils au hasard ?
- ❖ Quel est le taux relatif de contribution paternelle des différents clones ainsi que la part de pollen exogène au verger ?
- ❖ Les clones possèdent-ils tous le même niveau de fertilité et de qualité génétique au sein du verger ?
- ❖ Les caractéristiques génétiques (nombre d'allèles, fréquences alléliques ...) mesurées à l'aide des marqueurs moléculaires microsatellites diffèrent-elles entre les descendants du verger, la population parentale, la récolte commerciale et un peuplement?

II- MATERIEL ET METHODES

1. Composition du verger à graines France2-VG

France2 est un verger à graines de clones de douglas installé sur le site de Lavercantière dans le Lot en 1989 (Cf. annexe n°1). Ce verger est proche d'un autre verger de douglas, le verger à graines « Darrington ». Il est constitué de clones d'arbres dits « +++ », c'est-à-dire issu d'une sélection en 2 temps: d'arbres élites de 24 peuplements sélectionnés français, puis de demi-frères âgés de 10 ans dans un test de descendance maternelles de ces arbres élites. 138 individus ou clones ont été sélectionnés sur des caractères adaptatifs : tardiveté du débourrement végétatif, vigueur et forme (rectitude du tronc, angle d'insertion des branches). La méthode de sélection a été de type index multi-caractère combiné individu-famille, c'est-à-dire que chaque individu a été sélectionné selon sa valeur propre et la valeur de sa famille ou descendance maternelle. Chacun des 138 clones a été multiplié par voie de greffage, soit 578 ramets (1 à 13 ramets par clones) et installé de manière aléatoire. Régulièrement, les ramets sont stimulés afin d'obtenir une floraison abondante et équivalente pour tous les ramets.

2. Matériel biologique de l'étude

Les lots de graines étudiés descendances maternelles étudiées proviennent de deux récoltes de cônes réalisées dans le verger à graines France2-VG :

- une récolte en descendances maternelles non-commerciale réalisée de manière aléatoire sur la partie centrale du verger (Annexe 1). 135 ramets, correspondant à 76 clones (dont 40 clones dupliqués), ont été récoltés sous forme de cônes et envoyés au CGAF.
- une récolte commerciale réalisée par la sécherie de La Joux sur une partie seulement du verger à graines (Annexe 1). L'équipe de La Joux s'est chargée de la récolte des cônes, du décorticage. La récolte commerciale a été reçue sous forme d'un lot de 150 graines.

La population d'adultes étudiée est composée de 544 ramets (1 à 13 ramets par clone). Les données utilisées dans cette étude ont été acquises préalablement par B. Le Guerroué à partir des aiguilles récoltées sur ces individus.

3. Acquisition des données

La largeur et la longueur de 10 cônes par descendances maternelles ont été mesurées sur les 135 ramets avant d'en extraire la totalité des graines. Les graines ont ensuite été triées par le poids en soufflerie afin de séparer les graines pleines des graines vides. Les graines pleines et vides ont ensuite été dénombrées à l'aide d'un compteur de graines automatique puis pesées, ce qui a permis de calculer le poids de 1000 graines.

Elles ont ensuite été mises en stratification dans de la tourbe à 4°C durant 12 semaines. A la fin de cette période de froid, les graines ont été placées dans des boîtes de Pétri, sur milieu humide, afin de permettre leur germination. Les jeunes pousses ainsi obtenues ont ensuite été identifiées et placées au congélateur (-80°C) en attendant l'extraction d'ADN.

L'ADN génomique total a été extrait selon le protocole proposé par Nucleo®Spin 96 Plant II (Macherey Nagel) des aiguilles cotylédonaire. Les génotypes de 877 individus ont été obtenus en utilisant 11 marqueurs microsatellites nucléaires (Slavov *et al.* 2004) (Tableau I)

regroupés en trois kits multiplexes développés au laboratoire du CGAF par B. Le Guerroué (Annexe 2). Les cycles PCR durant l'étape d'amplification de l'ADN ont été effectués selon le protocole proposé par Guichoux *et al.* (2011) à l'aide d'un thermo-cycleur Mastercycler® ep gradient. Des témoins ont été placés dans chaque plaque PCR afin de faciliter la lecture des résultats la reproductibilité du processus. 2µL de produit PCR ont été ajoutés à 7,7µL de formamide (Life Technology) et 0,3µL de GeneScan 600liz (Life Technology). La migration a été effectuée sur un séquenceur automatique ABI3500. La lecture des données obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel GeneMapper V4.1. Les tailles des microsatellites ont été regroupées à l'aide de la macro Excel AUTOBIN (<https://www4.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Ressources/Logiciels/Autobin>).

Tableau I : Description des marqueurs microsatellites utilisés (Slavov *et al.* 2004)

Microsatellite	Amorces (5'-3')	Nombre d'allèle	Fréquence estimée d'allèle nul
PmOSU_1F9	F : CCTCATGCATTGGACACTC R : GGATTCTTGAGCAGGTAGG	33	0,008
PmOSU_2C2	F : TAAATCCGCAGCTCATAGAATC R : GGGTGGTGGCTAGGGAAAC	12	0,004
PmOSU_2C3	F : AAAGACAACATTATGAAAGG R : GTAATGGTTCGAAAAATAATG	25	0,000
PmOSU_2D4	F : TTATTGCACATGAGTATTATGA R : CAGATGTTGTTTTTATAACCAC	30	0,022
PmOSU_3B2	F : CTTTGGAGTTCCTTAATATAG R : GATAATAGCACCCCACCATA	27	0,005
PmOSU_3D5	F : GGCATCCTATTTTTCATTTT R : GTGATTACCTAACTTGTGC	19	0,000
PmOSU_3F1	F : GACTAGATCATCGCAACTT R : GGTATTCTTATGGTTTTTAT	20	0,108
PmOSU_3G9	F : ATTCCTTTTGAGACCTACTT R : CTTCAAAAATTCCTACAACA	22	0,034
PmOSU_4A7	F : TTGTAAAAATCCCATGTAT R : AAGTGGGGGAGTGTGTAAT	30	0,018
PmOSU_4G2	F : ATTTTTTGTATTGTGCTTG R : TGGATATATTTGCATTTTAC	16	0,003
PmOSU_2G12	F : CAAGGACTCATATGGGAAA R : AACATCAGTAATAACCTTTT	16	0,047

4. Analyses statistiques

❖ Détection des allèles nuls

Afin d'estimer la proportion d'allèle nul présent dans nos échantillons, nous avons utilisé le logiciel MICRO CHECKER 2.2 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Il permet de distinguer les allèles nuls, l'amplification préférentielle des allèles de faible taille et les erreurs de génotypage dû au bégaiement de la Taq polymérase. En utilisant le génotype multilocus, il permet aussi de faire la distinction entre la consanguinité, les effets Walhund et les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg dus aux allèles nuls. La fréquence d'allèles nuls pour chaque locus et population a été calculée selon Bookfield (1996).

❖ Estimation de la qualité génétique du verger et de la fertilité des clones récoltés

Le logiciel Genalex v6.4 (Peakall and Smouse 2006) a été utilisé pour estimer le nombre d'allèles (N_a), le nombre d'allèles efficace (N_e), l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e), ainsi que le nombre d'allèles privés (n). Le déséquilibre de liaison au seuil de significativité de 0,001, le F_{IS} , le F_{ST} ainsi que l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg à chaque locus ont été testés à l'aide du même logiciel.

Le logiciel R 3.0.2 a été utilisé pour analyser la variabilité des cônes : longueur, largeur, volume ainsi que le nombre de graines pleines par cône, poids de 1000 graines et taux de graines pleines par cône. Parmi les 76 clones récoltés, seuls les 40 clones dupliqués ont été analysés afin d'avoir une répétabilité des échantillons dans les analyses. Après avoir observé la distribution de nos différentes variables, des ANOVA à 1 facteur ont été réalisées afin de déterminer l'existence ou non d'un contrôle génétique de ces variables. L'impact de l'environnement (position du ramet au sein du verger à graines) sur les caractéristiques morphologiques des cônes a aussi été testé. Pour cela, des ANOVA à 2 facteurs avec un effet ramet hiérarchisé dans l'effet clone ont été réalisées. Enfin, nous nous sommes intéressés aux corrélations pouvant exister entre ces variables.

❖ Recherche de paternité à l'aide de CERVUS 3.0 (Marshall *et al.* 1998)

Les analyses de paternité ont été réalisées à partir des génotypes de 877 descendants et ceux des parents (B. Le Guerroué, com. pers.). Nous avons utilisé les méthodes d'assignation proposées par Marshall *et al.* (1998) fondées sur le calcul du rapport de vraisemblance (LOD score). Ce LOD score est défini par :

$$\text{LOD score} = \log | T (g_0/g_m, g_a) / T (g_0/g_m) |$$

avec g_0 , g_m et g_a les génotypes du descendant, de la mère et du père supposé, $T (g_0/g_m, g_a)$ la probabilité mendélienne d'avoir le descendant avec le génotype g_0 connaissant les génotypes de la mère (g_m) et du père (g_a), et $T (g_0/g_m)$ la même probabilité connaissant le génotype de la mère g_m et sachant que le père est tiré au hasard dans la population.

Pour chaque graine, un père a été assigné par maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel CERVUS 3.0. La paternité a été attribuée selon le critère Δ (Marshall *et al.* 1998) qui correspond à la différence des LOD score des 2 pères les plus probables. L'estimation de la valeur critique de Δ est faite à l'aide du logiciel CERVUS 3.0 en réalisant 10 000 simulations avec comme paramètres d'entrée un taux d'erreur de 0,01 et 135 individus comme pères potentiels (i.e. le nombre de clones présents dans le verger à graines). Les valeurs de Δ ont été déterminées pour des seuils de confiance d'attribution de 95% (« strict ») et 85% (« étendu »). La paternité est attribuée à l'individu ayant le LOD score le plus élevé seulement si Δ dépasse sa valeur critique.

III- RESULTATS

1. Caractérisation génétique des populations étudiées : adultes, descendants et récolte commerciale

❖ Caractérisation génétique des adultes

Parmi les 11 marqueurs microsatellites utilisés, le nombre d'allèle (N_a) varie de 17 à 41 avec une moyenne de 27,81 et un écart type de 2,362. Le nombre d'allèle efficace (N_e) varie lui de 5,95 à 19,71 avec une moyenne de 12,91 avec un écart type de 1,24. Le paramètre de diversité H_e (hétérozygotie attendue) varie de 0,832 à 0,949 selon les marqueurs avec une moyenne de

0,698 et un écart type de 0,06 alors que les valeurs de l'hétérozygotie observée sont comprises entre 0,362 et 0,928 avec une moyenne de 0,913 et un écart type de 0,01. Le F (indice de fixation) varie de -0,001 à 0,564 avec une moyenne de 0,238 et un écart type de 0,064. Le déficit en hétérozygotes est hautement significatif pour les 11 marqueurs.

Tableau I : Indices de diversité génétique par locus dans la population d'adulte : nombre total d'individus (N), nombre d'allèles (N_a), nombre d'allèles efficaces (N_e), hétérozygotie observé (H_o) et attendue (H_e) et écart à l'hypothèse de Hardy-Weinberg
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Locus	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F	HW pvalue
2G12	539	20	13,64	0,928	0,927	-0,001	0 ***
3B2	510	32	15,89	0,502	0,937	0,464	0 ***
3D5	531	23	10,23	0,55	0,902	0,391	0 ***
2C3	489	32	17,70	0,532	0,944	0,436	0 ***
3F1	517	28	14,58	0,702	0,931	0,246	0 ***
3G9	538	20	5,95	0,362	0,832	0,564	0 ***
4A7	537	36	14,14	0,836	0,929	0,1	0 ***
1F9	536	41	19,71	0,927	0,949	0,023	0 ***
2C2	539	23	9,89	0,857	0,899	0,047	0 ***
2D4	528	35	11,80	0,6	0,915	0,344	0 ***
4G2	539	17	8,49	0,879	0,882	0,003	0 ***
Moyenne	527,545	27,81	12,91	0,698	0,913	0,238	-
SE	4,844	2,362	1,240	0,060	0,010	0,064	-

❖ Caractérisation génétique des descendants

Au sein de la population de descendants, le nombre d'allèle et le nombre d'allèle efficace varient respectivement de 19 à 41 et de 4,824 à 12,852 avec une moyenne respectivement de 29,455 à 10,675 et un écart type de 2,238 à 0,973. Les paramètres de H_o et H_e varient respectivement de 0,423 à 0,898 et de 0,793 à 0,922 avec une moyenne respectivement de 0,712 et un écart type de 0,052 et de 0,896 et un écart type de 0,012. F (indice de fixation) oscille de -0,002 à 0,483 avec une moyenne de 0,208 et un écart type de 0,056. Le déficit en hétérozygote est hautement significatif pour 10 des 11 marqueurs utilisés (tableau II).

**Tableau II : Indices de diversité génétique par locus dans la population de descendants: nombre total d'individus (N), nombre d'allèles (N_a), nombre d'allèles efficaces (N_e), hétérozygotie observé (H_o) et attendue (H_e) et écart à l'hypothèse de Hardy-Weinberg
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$**

Locus	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F	HW P value
2G12	869	19	12,255	0,841	0,918	0,084	0 ***
3B2	796	33	12,852	0,477	0,922	0,483	0 ***
3D5	841	32	8,532	0,618	0,883	0,3	0 ***
2C3	778	31	11,246	0,529	0,911	0,419	0 ***
3F1	847	30	12,316	0,724	0,919	0,212	0 ***
3G9	846	20	4,824	0,423	0,793	0,467	0 ***
4A7	848	37	17	0,855	0,941	0,091	0 ***
1F9	873	41	10,637	0,898	0,906	0,009	0 ***
2C2	871	22	8,728	0,86	0,885	0,029	0,152 ns
2D4	859	36	11,658	0,738	0,914	0,192	0 ***
4G2	874	23	7,433	0,867	0,865	-0,002	0 ***
Moyenne	845,636	29,455	10,675	0,712	0,896	0,208	-
SE	9,529	2,238	0,973	0,052	0,012	0,056	-

❖ **Caractérisation génétique du lot commercial**

Au sein du lot commercial, le nombre d'allèle et le nombre d'allèle efficace varient respectivement de 13 à 30 et de 7,194 à 15,659 avec respectivement une moyenne de 21,182 et un écart type de 1,838 et de 11,044 avec un écart type de 1,024 selon les marqueurs (Tableau III). Les paramètres de diversité H_o et H_e oscillent respectivement de 0,432 à 0,963 avec une moyenne de 0,700 et un écart type de 0,065 et de 0,861 à 0,936 avec une moyenne de 0,901 et un écart type de 0,009. Le F oscille de -0,035 à 0,525 avec une moyenne de 0,224 et un écart type de 0,071. Le déficit en hétérozygotes est hautement significatif pour 6 des 11 marqueurs utilisés et non significatif pour 4 des marqueurs.

Tableau III : Indices de diversité génétique par locus dans le lot commercial: nombre total d'individus (N), nombre d'allèles (N_a), nombre d'allèles efficaces (N_e), hétérozygotie observé (H_o) et attendue (H_e) et écart à l'hypothèse de Hardy-Weinberg
 * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Locus	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F	HW Pvalue
2G12	82	16	9,167	0,902	0,891	-0,013	0,480 ns
3B2	81	25	15,659	0,444	0,936	0,525	0 ***
3D5	80	13	7,26	0,475	0,862	0,449	0 ***
2C3	68	19	13,749	0,448	0,927	0,517	0 ***
3F1	81	23	13,018	0,753	0,923	0,184	0 ***
3G9	82	16	7,194	0,432	0,861	0,498	0 ***
4A7	83	29	15,429	0,867	0,935	0,072	0,39 *
1F9	82	30	14,538	0,963	0,931	-0,035	0,824 ns
2C2	82	20	8,941	0,854	0,888	0,039	0,429 ns
2D4	81	25	8,639	0,654	0,884	0,26	0 ***
4G2	82	14	7,685	0,878	0,87	-0,009	0,565 ns
Moyenne	80,364	21,182	11,044	0,700	0,901	0,224	-
SE	1,260	1,838	1,024	0,065	0,009	0,071	-

❖ Comparaison des paramètres de diversité des 3 populations

En comparant les paramètres de diversité des 3 populations étudiés (adultes, descendants et lot commercial), nous pouvons constater que les descendants présentent le nombre d'allèle le plus important (Tableau IV). Cependant, en termes de fréquence allélique supérieur à 5%, ce sont les adultes et le lot commercial qui présentent les valeurs les plus élevées.

Les adultes présentent le nombre d'allèles efficaces le plus élevé. En ce qui concerne le nombre d'allèles privés (i.e. le nombre d'allèle spécifique à chaque population), nous pouvons constater que ce sont les descendants qui présentent la valeur la plus élevée.

Tableau IV : Diversité comparée entre les populations Adultes, Descendants et lot commercial

Population	N_a	N_e	Na Freq. $\geq 5\%$	No. Private Alleles
Adultes	27,909	12,915	6,909	2,636
Descendants	29,455	10,67	6,545	4,182
Lot commercial	20,909	11,025	6,909	0,545

Le coefficient de consanguinité oscille de -0,003 à 0,511 avec une moyenne de 0,223 et un écart type de 0,063. Les locus 2C3 et 3B2 possède la valeur de F_{ST} (0,010) la plus importante

et le locus 4A7 la valeur la plus faible (0,004) avec une moyenne de 0,007 et un écart type de 0,001. Les locus 2G12, 1F9, 2C2 et 4G2 ne montrent pas d'écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

Tableau V : Coefficient de consanguinité (F_{IS}) et de différenciation (F_{ST}) et écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$**

Locus	F_{IS}	F_{ST}	HW Pvalue
2G12	0,020	0,005	0,48 ns
3B2	0,490	0,010	0 ***
3D5	0,379	0,007	0 ***
2C3	0,456	0,010	0 ***
3F1	0,215	0,006	0 ***
3G9	0,511	0,007	0 ***
4A7	0,084	0,004	0,039 *
1F9	-0,001	0,008	0,824 ns
2C2	0,039	0,005	0,429 ns
2D4	0,266	0,005	0 ***
4G2	-0,003	0,005	0,565 ns
Moyenne	0,223	0,007	- -
SE	0,063	0,001	- -

2. Caractérisation des allèles nuls

❖ Détection des allèles nuls

Afin de pouvoir mener à bien notre analyse nous avons été contraint de supprimer des individus dans les descendants. En effet, le logiciel MICROCHECKER ne permet pas d'analyser plus de 750 individus par populations. Les individus ont été supprimés de manière aléatoire dans les descendance maternelles. Dans la suite des analyses, comme Oddou-Muratorio et al. (2008), nous considérerons que tous les locus dont la fréquence en allèle nul est inférieure à 8% ne présentent pas d'allèle nul.

Dans chacune des 3 populations, des allèles nuls ont détectés (tableau VI). Ceux-ci ne sont pas présents à tous les locus dans toutes les populations. Quatre locus (2 G12, 4G2, 1F9 et 4G2) ne présentent pas d'allèles nuls dans toutes les populations. Le locus 4A7 ne présente pas d'allèle nul au niveau des adultes et des descendance. Pour les autres locus, les fréquences vont de 48,14% pour 2C3 dans la population des descendants à 10,89% pour le locus 4A7 du lot commercial.

Tableau VI : Détection des allèles nuls par locus et par population

Locus	adulte		descendants		lot commercial	
	fréquence	Présence d'allèle nul	fréquence	Présence d'allèle nul	fréquence	Présence d'allèle nul
2G12	0	Non	0,0333	Non	0,0595	Non
3B2	0,3028	Oui	0,2896	Oui	0,3154	Oui
3D5	0,2077	Oui	0,2664	Oui	0,2219	Oui
2C3	0,3341	Oui	0,4814	Oui	0,3814	Oui
3F1	0,1876	Oui	0,1337	Oui	0,1542	Oui
3G9	0,2563	Oui	0,2693	Oui	0,2557	Oui
4A7	0,0483	Non	0,035	Non	0,1089	Oui
1F9	0,0264	Non	0,0207	Non	0,0175	Non
2C2	0,022	Non	0,0516	Non	0,0217	Non
2D4	0,1966	Oui	0,1673	Oui	0,1305	Oui
4G2	0,0016	Non	0,037	Non	0,0095	Non

3. Contribution paternelle des clones

Les analyses de paternité ont été réalisées pour l'ensemble des 29 descendance. Les analyses ont été menées en plusieurs temps. Dans un premier temps, nous n'avons utilisé que les 4 marqueurs qui présentent un taux d'allèle nul inférieur à 8%, puis nous avons ajouté successivement les marqueurs en fonction de leur fréquence en allèle nul. Pour chaque graine, un père a été assigné par un maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel Cervus (Marshall *et al.* 1998). Parmi les 877 graines, 79% ont pu être assignées à un seul père à un seuil de confiance de 95% et 3% au seuil de 80%. La proportion de graines sans père compatible varie d'une descendance à l'autre. Les graines sans pères compatibles peuvent être issus d'événement de fécondation avec des pères situés en dehors du verger à graine France2. Les pourcentages élevés de graines non assignées sont observés essentiellement chez les clones avec une faible densité de reproducteur.

Selon la descendance étudiée, nous pouvons noter une forte variabilité du taux d'attribution de père des clones : en effet, celui-ci varie de 20% à 100% (Figure 1).

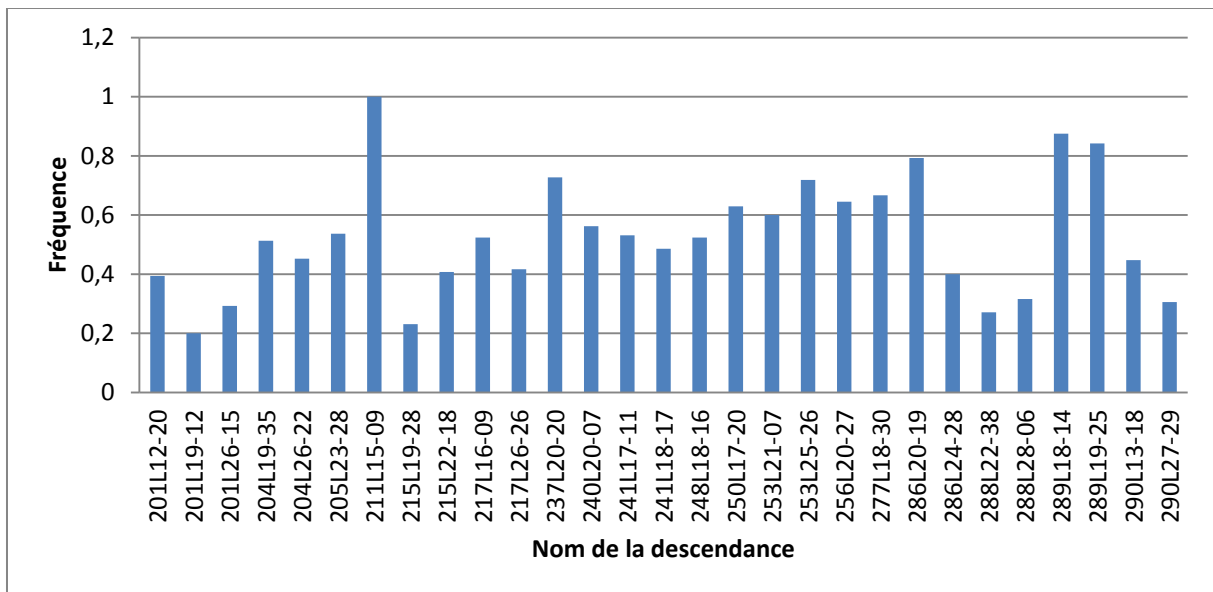


Figure 1 : Taux de pères attribués par descendance

Sur la figure 2, nous pouvons constater que chaque clone ne contribue pas de manière égale à la reproduction au sein du verger. Sur les 135 clones considérés comme pères potentiels, 45 ne participent pas au pool génétique des 29 descendance analysées.

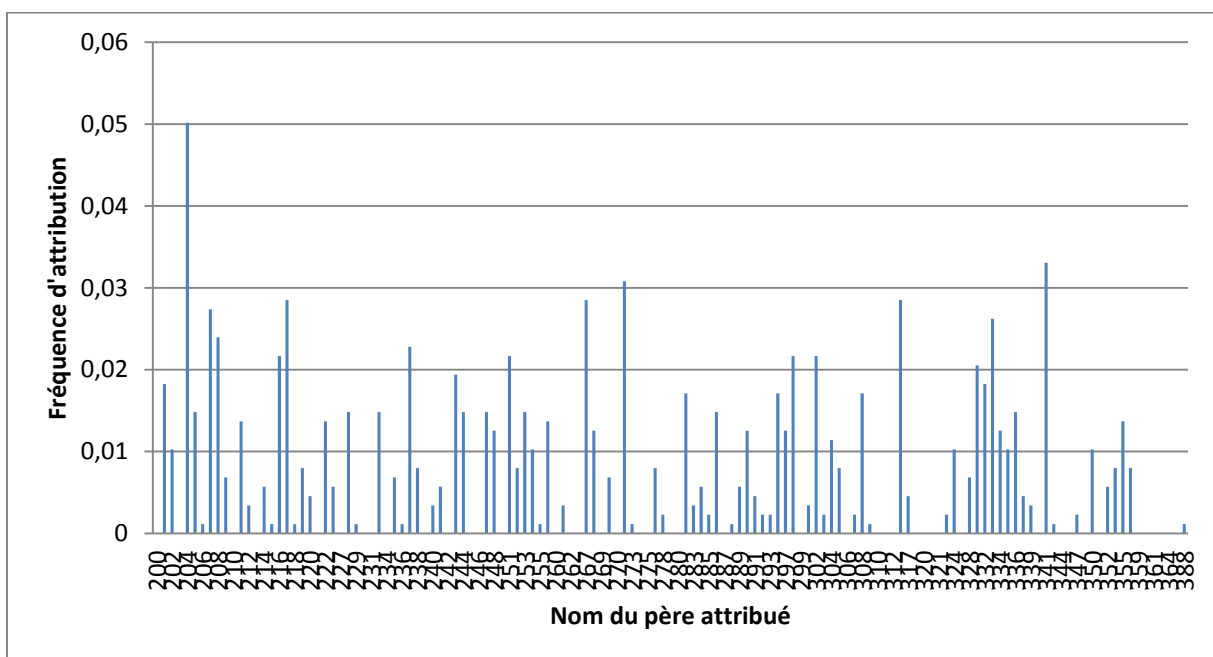


Figure 2 : Contribution paternelle des clones au sein du verger France2.

4. Caractérisation de la fertilité des clones récoltés

❖ Impact génétique sur la fertilité des clones

Les résultats du test ANOVA 1 facteur sur l'effet clone sont présentés dans le tableau VII. Nous pouvons constater que ces résultats sont hautement significatifs pour toutes les variables étudiées.

Tableau VII : Résultats des tests ANOVA 1 facteur pour l'effet clone. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Variables testées	Résultat du test
Taux de graines pleines	***
Nombre de graines pleines par cône	***
Poids de 1000 graines	***
Longueur du cône	***
Largeur du cône	***
Volume du cône	***

❖ Impact de l'environnement

L'effet de l'environnement, i.e. la localisation du ramet au sein du verger, n'a été testé que sur les critères morphologiques des cônes (longueur, largeur, volume). Les résultats des tests sont regroupés dans le tableau VIII. Nous pouvons ainsi constater que le test est hautement significatif pour chacune de ces variables.

Tableau VIII : Résultats des tests ANOVA avec effet hiérarchisé Clone : Ramet. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001

Variables testées	Résultats
Longueur du cône	***
Largeur du cône	***
Volume du cône	***

❖ Existe-t-il un lien entre les variables étudiées ?

Sur la figure 3, nous pouvons noter que plusieurs variables sont corrélées entre elles : la largeur et la longueur des cônes, la largeur et le volume des cônes, la longueur et le volume

des cônes, le nombre de graines pleines par cône et le taux de graines pleines par cône. Nous pouvons aussi noter une corrélation entre le poids de 1000 graines et le volume des cônes.

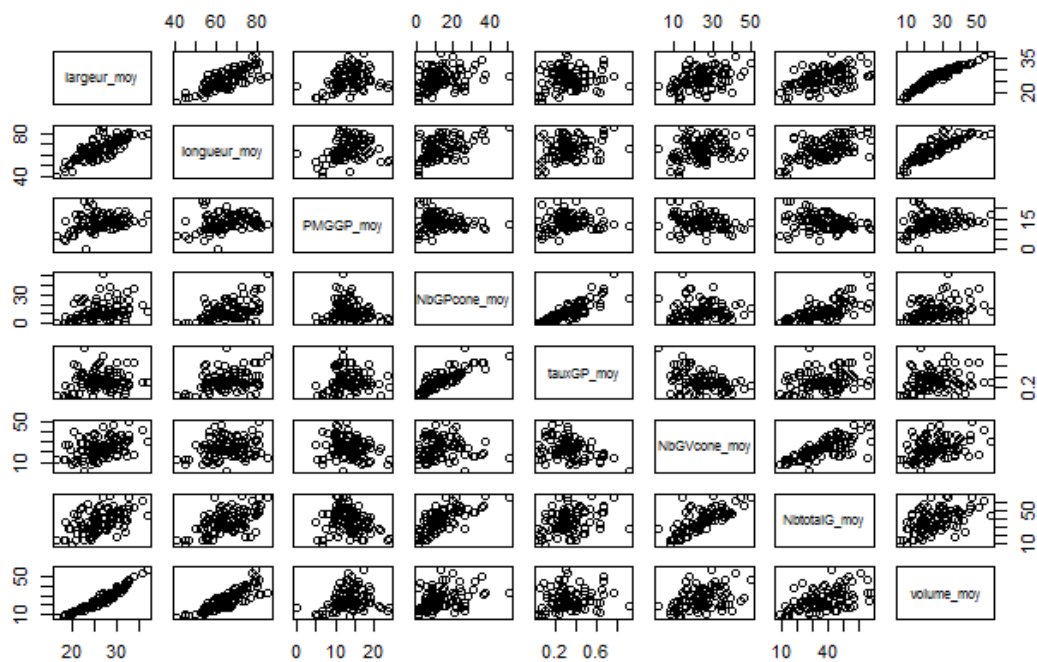


Figure 3 : Graphique de corrélation entre les différentes variables étudiées : longueur, largeur, volume des cônes, nombre de graines pleines par cône, taux de graines pleines par cône, poids de 1000 graines.

En observant la figure 4, nous pouvons constater que le taux de graines pleines ne semble pas corrélé avec la quantité d'arbres pollinisateurs les plus proches de l'arbre mère.

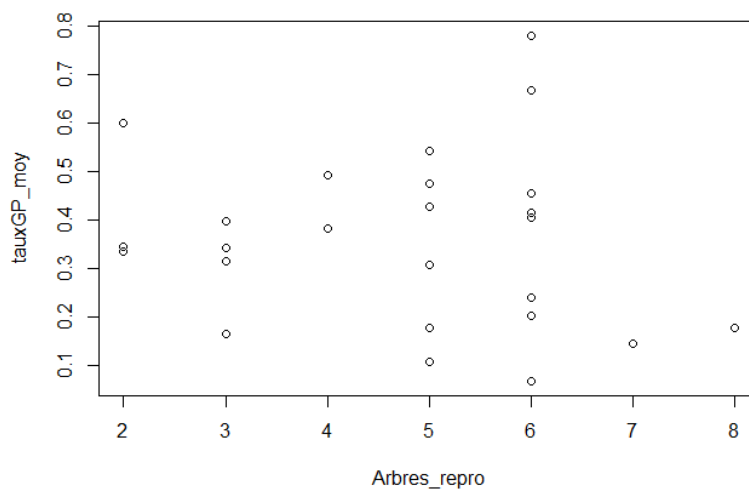


Figure 4 : Taux de graines pleines en fonction de la quantité d'arbres reproducteurs présents autour de l'arbre mère.

De même, le niveau de diversité H_e ne semble pas corrélé avec la quantité d'arbres reproducteurs présents autour de l'arbre mère (Cf. figure 5).

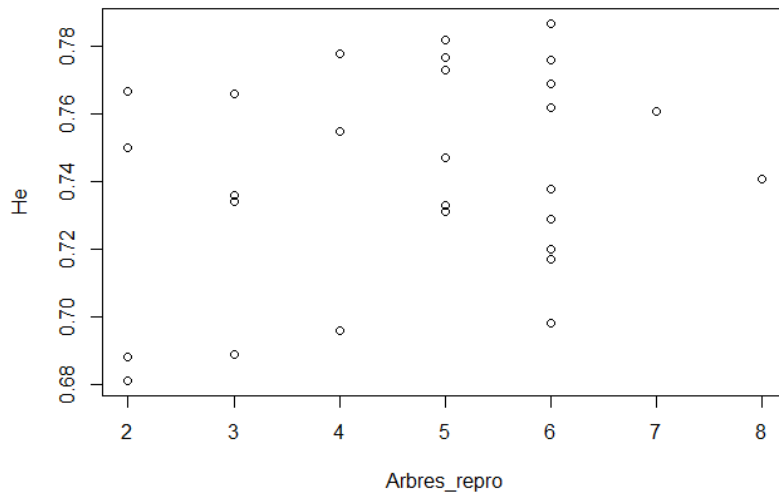


Figure 5 : Niveau de diversité H_e en fonction de la quantité d'arbres reproducteurs présents autour de l'arbre mère.

IV- DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons comparé la diversité génétique neutre entre la population d'adultes composés de 135 clones répétés plusieurs fois au sein du verger, des descendances maternelles de ce même verger et une récolte commerciale.

1. Qualité des marqueurs

Dans tous nos échantillons, à tous les locus, un excès d'homozygotes a été détecté. Il est hautement significatif pour tous les locus chez la population d'adulte, Celui-ci varie pour tous les marqueurs chez les adultes, pour 10 des 11 marqueurs chez les descendants et pour 6 des 11 marqueurs chez le lot commercial. La présence d'allèles nuls ne peut être exclue pour expliquer ces forts déficits en hétérozygotes. Parmi les 11 marqueurs microsatellites utilisés, seul le marqueur 3F1 est mentionné par Slavov *et al.* (2004) comme pouvant présenter un taux non négligeable d'allèles nuls (bien qu'inférieur au taux constaté ici).

Si les microsatellites sont de nos jours les marqueurs les plus couramment employés et qu'ils ont largement contribué à l'accroissement des études de parentés, leur niveau de polymorphisme élevé et leur facilité de mise en œuvre peuvent paradoxalement aussi entraîner des erreurs et en particulier une sur estimation des homozygotes, erreurs qui ne sont pas assez prises en compte. Dans cette étude, nous avons grâce aux témoins positionnés dans toutes les PCR pu limiter les erreurs de lectures dues à un glissement des tailles d'allèles détectées. D'autre part, nous avons aussi utilisés des échantillons qui possédaient une concentration équivalente afin d'éviter l'amplification préférentielle des allèles de faible taille (dropout, Miller et Wait 2003). Ce phénomène ne peut toutefois pas complètement être écarté. D'autre part, le glissement pendant l'amplification des motifs microsatellites peut fabriquer des fragments dont la taille diffère du motif originel par des multiples de ce motif (suttering, Shinde et al. 2003). Ceci rend compliqué en particulier dans le cas des motifs dinucléotide de distinguer entre les homozygotes et les hétérozygotes. Enfin, des mutations peuvent subvenir dans les sites d'amorces et certains allèles ne peuvent pas être amplifiés ce qui entraîne l'apparition de faux homozygote (allèle nul, Shaw *et al.* 1999).

Ces erreurs de génotypages peuvent être la cause d'un écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg et un particulier un déficit d'hétérozygote (Shaw et al. 1999). Ces écarts sont confondus avec ceux du à la consanguinité, à l'homogamie ou à l'effet Walhund. Néanmoins, que cela soit le suttering, le dropout ou les allèles nuls, ils ont leur signature propre (i.e des carences et des excès de génotypes particuliers) qui permet de les distinguer des autres causes d'excès d'homozygotes (Miller *et al.* . 2002; Miller et Waits 2003). Dès 1996, Brookfield a proposé plusieurs méthodes pour estimer la fréquence d'allèle nul à partir d'un excès d'homozygote. Dans un de ces méthodes, il prend en compte à la fois les effets du suttering, des non amplifications du à la qualité de l'ADN, du drop out et des allèles nuls. De plus, des analyses multilocus peuvent normalement permettre de faire la différences entre ces facteurs et les allèles nuls (Dakin and Avise 2004). La comparaison des génotypes des mères et des descendances maternelles permet, en effet, de détecter des « faux homozygotes » du à la présence d'allèle nul. L'application de la méthode de Brookfield (1996) qui prend en compte les différentes causes d'excès d'homozygote du à des erreurs de génotypes met en évidence des fréquences d'allèles nuls qui peuvent très élevées (jusqu'à plus de 48% pour le marqueur 2C3 chez la population de descendants). Même si cette fréquence est très importante celle-ci peut atteindre théoriquement 1, des études ont déjà détectées des fréquences équivalentes

voire supérieures (Dakin and Avise 2004). Les fréquences des autres locus sont comme 80% des cas étudiés dans la revue de Dakin and Avise 2004 inférieures à 40%.

Néanmoins de nombreux auteurs pointent du doigt la difficulté d'utiliser des marqueurs dont la fréquence détecté en allèles nul est supérieur à 8% pour les analyses de parenté (Dakin and Avise 2004, Oddou-Muratorio *et al.* 2009). Les erreurs de mauvaise attribution augmentent avec la fréquence des allèles nuls, néanmoins Dakin and Avise (2004) montrent qu'il est préférable d'augmenter le nombre de marqueurs que le nombre d'individus.

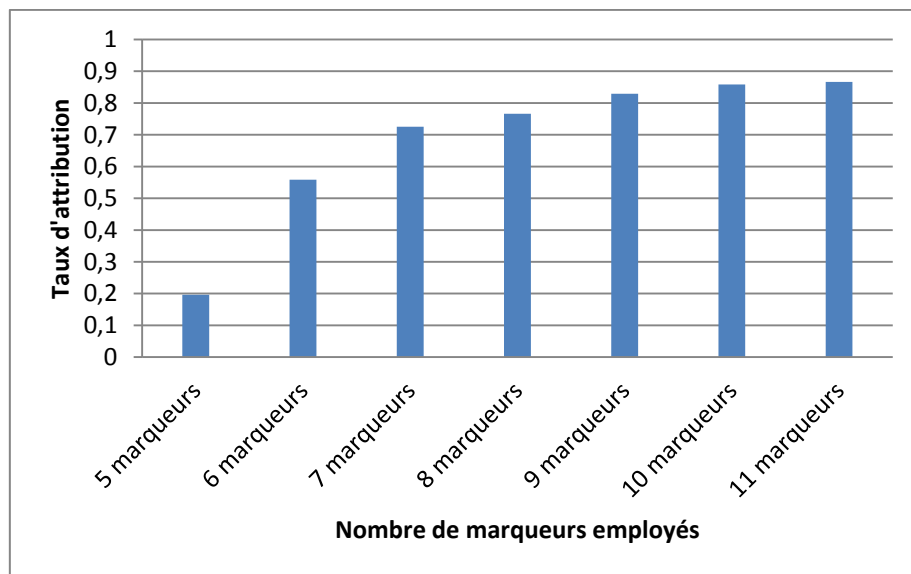


Figure 6 : Taux d'attribution des clones en fonction du nombre de marqueurs employés

Afin d'écartier au maximum les risques d'erreurs liés aux allèles nuls, nous avons aussi réalisé une analyse de paternité en n'utilisant, dans un premier temps, seulement les 5 marqueurs présentant un taux d'allèles nuls inférieurs à 8%. Puis nous avons ajouté les marqueurs restants un par un afin d'évaluer le taux d'assignation en fonction du nombre de marqueurs utilisés (Figure 6).

Nous pouvons ainsi constater l'importance, dans notre étude, d'utiliser la totalité des marqueurs afin d'attribuer au mieux un père à chaque descendant.

2. Taux relatif de contribution paternelle des différents clones

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que tous les clones ne contribuent pas aux flux de gènes (45 clones ne contribuent pas du tout). Cela peut être dû à notre échantillonnage qui a été réalisé que sur 29 descendances maternelles. L'analyse sur les 135 descendances reçues permettra de confirmer ou non ces résultats. Mais ce résultat peut aussi être attribué à la localisation des clones et à la synchronisation florale. En effet, les arbres dont la floraison est soit très précoce soit très tardive peuvent ne pas participer à la reproduction. Le rôle de la phénologie de floraison dans le succès reproducteur mâle a été démontré par Erickson *et al.* 1989 et Burczyk *et al.* 1997. En effet, les individus ayant tendance à fleurir plus tôt ou plus tard que la moyenne peuvent voir leur succès reproducteur sensiblement réduit (Burczyk *et al.* 1997). De même les clones les plus distants ont moins de chance de contribuer à la descendance.

Nous avons aussi pu mettre en évidence que tous les descendants d'un même clone n'avaient pas le même nombre de pères. En effet, nous pouvons supposer que les contributions polliniques agrégées par un ramet vont différer selon que celui-ci est isolé ou « bien entouré ». De même, nous pouvons supposer qu'un clone répété plusieurs fois dans le verger participera activement aux échanges de pollen. Nous avons testé cette hypothèse en figure 7. Une corrélation entre la contribution paternelle et la répétition des ramets est envisageable. Cependant, malgré cette tendance, il faudrait approfondir nos analyses sur les 135 descendances maternelles.

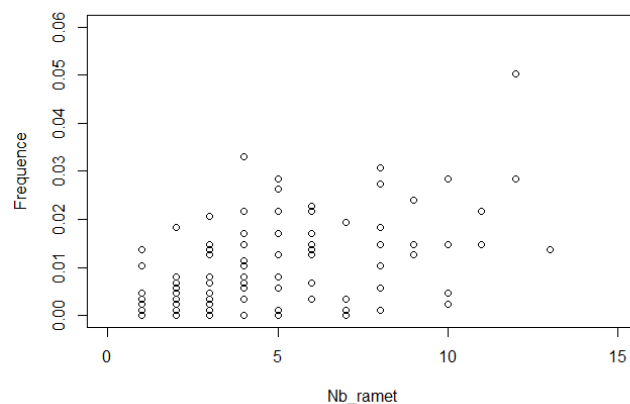


Figure 7 : Fréquence d'attribution des clones en fonction du nombre de ramets par clone.

3. Part de pollen exogène au verger ?

Nous avons pu attribuer un père à plus de 90% des descendance ce qui indique une faible part de pollen exogène. En verger à graines, produire des variétés améliorées ou garantir une origine génétique particulière, nécessite de s'assurer que la population de reproducteurs composant le verger n'est pas pollinisée par des individus extérieurs au verger. De telles contaminations polliniques peuvent provoquer une modification de la composition génétique des lots de semences et/ou une diminution du gain génétique espéré (Wheeler et Jech, 1986 ; Stoehr et al., 2004). Les recherches ont porté très tôt sur l'estimation de cette contamination (évaluée par la proportion de graines issues de pollinisation par des pères situés hors verger), soit par piégeage de pollen (Castaing et Vergeron, 1976 ; Geary, 1970) soit par analyse de descendance maternelles à l'aide de marqueurs moléculaires de type isozyme (Nagasaka et Szmidt, 1985 ; Harju et Nikkanen, 1996) ou microsatellite (Plomion et al., 2001 ; Moriguchi et al., 2007). Les taux de contamination estimés, bien que variables entre vergers et entre individus au sein d'un même verger (Moriguchi et al., 2005 ; Slavov et al., 2005), se révèlent souvent très élevés et peuvent varier de 1 à 90%. Cette forte variabilité peut s'expliquer par :

- le degré d'isolement du verger par rapport aux boisements voisins de même espèce et la taille relative des peuplements voisins sources potentielles de pollen (Moriguchi et al., 2005) comparée à celle des vergers à graines (Adams et al., 1997). En effet pour de nombreuses espèces sociales telles que le douglas, le pin sylvestre ou les épicéas, les vergers à graines sont souvent installés dans la zone d'amélioration ou breeding zone pour laquelle est produite la graine améliorée. Le niveau d'isolement est dans ce cas souvent faible.
- la position des arbres mères en verger et notamment leur distance à la lisière du verger, voisins ou l'exposition du verger aux vents dominants (Moriguchi et al., 2005 ; Yazdani et Lindgren, 1991 ; Adams et al., 1997 ; Plomion et al., 2001 ; mais voir Fernandes et al., 2008) ;
- une variation de la densité de tiges à l'intérieur du verger (Caron et Leblanc, 1992 ; Pakkanen et al., 2000) ;
- une faible production de pollen au sein de verger à graines (Kaya et al., 2006 ; Wang et al., 1991 ; Muona et Harju, 1989), notamment dans les jeunes vergers, la maturité sexuelle femelle intervenant plus tôt que la maturité sexuelle mâle chez de nombreuses espèces ;

- la synchronie de floraison entre les arbres du verger et ceux des boisements alentours (Adams et al., 1997) ainsi que la variabilité de précocité de floraison femelle au sein même du verger, les individus les plus précoces ou tardifs étant les plus soumis à contamination (Slavov et al., 2005a ; Yazdani et Lindgren, 1991 ; El-Kassaby et Ritland, 1986 ; Yazdani et al., 1995).

4. Niveau de fertilité et qualité génétique au sein du verger ?

Cette étude a permis de mettre en évidence la variabilité existante du rendement en graines entre les différents clones du verger. L'impact de la génétique, fortement soupçonné, sur les différents paramètres étudiés a pu être confirmé. De même, la plupart des corrélations mises en évidence étaient attendues. Celle qui a retenu notre attention est la corrélation entre le poids de 1000 graines et le volume du cône. En effet, le poids de 1000 graines témoigne des capacités de réserve des graines. Il représente donc un critère de qualité physiologique des graines viables. Si ce critère est corrélé avec le volume du cône, cela suggère qu'un cône de gros volume sera plus à même de produire des graines lourdes et donc plus viables. Cette information pourrait s'avérer intéressante pour un forestier ou gestionnaire de verger lors de la récolte des cônes. De plus, nous avons pu mettre en évidence, à l'aide d'un test ANOVA avec effet hiérarchisé, le rôle de l'environnement sur les caractéristiques morphologiques du cône. Pour obtenir des graines viables, il faut donc prendre en compte les caractéristiques génétiques de l'arbre mais aussi son environnement.

Aucune corrélation n'a pu être établie entre le taux de graines pleines et la quantité d'arbres pollinisateurs les plus proches de l'arbre mère. De même, nous n'avons pas établi de corrélation entre le niveau de diversité H_e et le nombre d'arbres pollinisateurs présents autour de l'arbre mère. Ces résultats suggèrent qu'un arbre isolé peut être tout aussi productif qu'un arbre fortement entouré.

5. Différence entre les caractéristiques génétiques des 3 populations étudiées ?

Nos résultats nous permettent de constater un niveau de diversité relativement élevé au sein du verger à graine France2. Celui-ci est caractérisé par un N_a et un H_e élevés pour les 3 populations étudiées. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Slavov et al. (2004), probablement du fait de la taille plus importante des populations génotypées. Il existe dans les

3 populations un excès d'homozygotes. Ce déficit en hétérozygotes obtenu par estimation multilocus est significatif, contrairement à ce qui attendu dans la plupart des études sur des espèces longévives à reproduction préférentiellement allogame (Aspe 2009). Cet excès peut être du comme discuté plus haut à des allèles nuls. Toutefois dans la population d'adulte, nous ne pouvons exclure un effet Walhund spatial. En effet, le verger à graines est composé de 24 populations sélectionnées alors que nous avons considéré que nous avions qu'une seule et même population.

En comparant nos résultats obtenus avec ceux obtenus par O. Boussaid (2008) sur un peuplement de La Vergne, nous avons pu constater que les différents indices de diversité sont équivalents contrairement à ce qui était attendu. Toutefois, l'analyse de la variabilité des descendances maternelles sur des caractères adaptatifs de ces deux dispositifs montrent une variabilité beaucoup plus importante du peuplement naturel (S. Guerinet com. pers.).

Nous avons pu constater que le nombre d'allèles (ainsi que le nombre d'allèles privés) était plus important chez les descendants que chez les adultes, ce qui nous indique la présence de nouveaux allèles dans cette population de descendants. La pollinisation des vergers à graines se réalisant par le vent, seul l'apport d'un pollen exogène au verger peut expliquer cette apparition de nouveaux allèles. Les « seuls » arbres susceptibles de contaminer les flux de pollen de France2 sont ceux présents dans le verger voisin, situé à environ 400m de la zone d'étude : le verger Darrington.

CONCLUSION

Ce travail a permis de mettre en évidence la qualité génétique du verger à graines France2. Nous avons pu constater un excès d'homozygotes, probablement dû à la forte présence d'allèles nuls sur nos marqueurs microsatellites nucléaires. Les caractéristiques génétiques mis en évidence nous permettent de mettre en avant le bon brassage pollinique au sein de ce verger.

Une analyse plus approfondie sur la totalité des descendances maternelles reçues pourrait permettre de compléter ces résultats. Un calcul des distances entre les différents ramets du verger, dans des études futures, pourrait permettre de caractériser de façon précise les nuages polliniques. Il faudrait aussi prendre en compte la direction du vent ainsi qu'intégrer les données de phénologie de floraison.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier toute l'équipe du CGAF de m'avoir accueillie durant ces 6 mois. Merci donc à Brigitte Musch de m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de son équipe, je tiens également à la remercier pour son temps et sa patience. Merci à Bénédicte Le Guerroué pour sa patience et sa grande disponibilité lors des manipulations de laboratoires. Elle a toujours été présente pour répondre à la moindre petite question. Merci à Yves Rousselles pour son aide lors des analyses statistiques sous R.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du CTC pour m'avoir accueillie durant ces 2 jours dans le Lot. Ce fût une expérience très enrichissante.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS, W. T., HIPKINS, V. D., BURCZYK, J. & RANDALL, W. K. (1997). Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research* 27, 131-134.
- Angelier, Ariane. (2007). *Douglasaies françaises*. [Paris]: Office national des forêts.
- Boussaid, Ouzna. (2008). "Qualité Génétique D'une Régénération Naturelle de Douglas Vert, *Pseudotsuga Menziesii* (Mirb.) Franco."
- Brookfield JFY (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5, 453-455.
- Burczyk, J. L., and D. Prat. (1997). "Male Reproductive Success in *Pseudotsuga Menziesii* (Mirb.) France: The Effects of Spatial Structure and Flowering Characteristics." *Heredity* 79 (December): 638-47. doi:10.1038/hdy.1997.210.
- CARON, G. E. & LEBLANC, R. (1992). Pollen Contamination in a Small Black Spruce Seedling Seed Orchard for 3 Consecutive Years. *Forest Ecology and Management* 53, 245-261.
- CASTAING, J. P. & VERGERON, P. (1976). Experimental investigation of pollen contamination in the Maritime Pine seed orchard at Sore (Landes). *Annales des Sciences Forestières* 33.
- Dakin, E E, and J C Avise. (2004). "Microsatellite Null Alleles in Parentage Analysis." *Heredity* 93 (5): 504-9. doi:10.1038/sj.hdy.6800545.
- Erickson, V. J., and W. T. Adams. (1989). "Mating Success in a Coastal Douglas-Fir Seed Orchard as Affected by Distance and Floral Phenology." *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 19 (10): 1248-55.
- EL-KASSABY, Y. A. & RITLAND, K. (1986). Low-Levels of Pollen Contamination in a Douglas-Fir Seed Orchard as Detected by Allozyme Markers. *Silvae Genetica* 35, 224-229.
- FERNANDES, L., ROCHETA, M., CORDEIRO, J., PEREIRA, S., GERBER, S., OLIVEIRA, M. M. & RIBEIRO, M. M. (2008). Genetic variation, mating patterns and gene flow in a *Pinus pinaster* Aiton clonal seed orchard. *Annals of Forest Science* 65, 706p701-706p710.
- GEARY, T. F. (1970). Direction and distance of Pine pollen dispersal and seed orchard location on the Copperbelt of Zambia. *Rhodesian Journal of Agricultural Research* 8, 123-130.
- Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Léger, and R.J. Petit. (2011). "Two Highly Validated Multiplexes (12-Plex and 8-Plex) for Species Delimitation and Parentage Analysis in Oaks (*Quercus* Spp.)." *Molecular Ecology*.
- HARJU, A. M. & NIKKANEN, T. (1996). Reproductive success of orchard and nonorchard pollens during different stages of pollen shedding in a Scots pine seed orchard. *Canadian Journal of Forest Research* 26, 1096-1102.
- KAYA, N., ISIK, K. & ADAMS, W. T. (2006). Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. *New Forests* 31, 409-416.

Miller CR, Joyce P, Waits LP (2002) Assessing allelic dropout and genotyping reliability using maximum likelihood. *Genetics*, 160, 357–366.

MORIGUCHI, Y., TANI, N., ITOO, S., KANEHIRA, F., TANAKA, K., YOMOGIDA, H., TAIRA, H. & TSUMURA, Y. (2005). Gene flow and mating system in five *Cryptomeria japonica* D. Don seed orchards as revealed by analysis of microsatellite markers. *Tree Genetics and Genomes* 1, 174-183.

MUONA, O. & HARJU, A. (1989). Effective Population Sizes, Genetic-Variability, and Mating System in Natural Stands and Seed Orchards of *Pinus-Sylvestris*. *Silvae Genetica* 38, 221-228.

NAGASAKA, K. & SZMIDT, A. E. (1985). Multilocus analysis of external pollen contamination of a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchard. *Population genetics in forestry, Lecture notes in biomathematics* 60, 134-138.

Oddou-Muratorio, Sylvie, Giovanni G. Vendramin, Joukje Buiteveld, and Bruno Fady. (2009). “Population Estimators or Progeny Tests: What Is the Best Method to Assess Null Allele Frequencies at SSR Loci?” *Conservation Genetics* 10 (5): 1343–47. doi:10.1007/s10592-008-9648-4.

PAKKANEN, A., NIKKANEN, T. & PULKKINEN, P. (2000). Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15, 399-404.

PLOMION, C., LEPROVOST, G., POT, D., VENDRAMIN, G., GERBER, S., DECROOCQ, S., BRACH, J., RAFFIN, A. & PASTUSZKA, P. (2001). Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Canadian Journal of Forest Research* 31, 1816-1825.

Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR (1999) Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 8, 407–417.

Shinde D, Lai YL, Sun FZ, Arnheim N (2003) Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acid Research*, 31, 974–980.

Slavov, G. T., G. T. Howe, I. Yakovlev, K. J. Edwards, K. V. Krutovskii, G. A. Tuskan, J. E. Carlson, S. H. Strauss, and W. T. Adams. (2004). “Highly Variable SSR Markers in Douglas-Fir: Mendelian Inheritance and Map Locations.” *TAG Theoretical and Applied Genetics* 108 (5): 873–80. doi:10.1007/s00122-003-1490-y.

Stoehr, M. U., B. L. Orvar, T. M. Vo, J. R. Gawley, J. E. Webber, and C. H. Newton. (1998). “Application of a Chloroplast DNA Marker in Seed Orchard Management Evaluations of Douglas-Fir.” *Canadian Journal of Forest Research* 28 (2): 187–95.

STOEHR, M. U., WEBBER, J. E., HOLLEFREUND, C. C. A. & PAINTER, R. A. (2004). Potential pollen contamination effects on progeny from an off-site Douglas-fir seed orchard: 9-year field results. *Canadian Journal of Forest Research* 34, 981-984.

Valadon, Alain. (2009). *Effets des interventions sylvicoles sur la diversité génétique des arbres forestiers analyse bibliographique*. Dossier Forestier 21. Paris: Office National des Forêts.

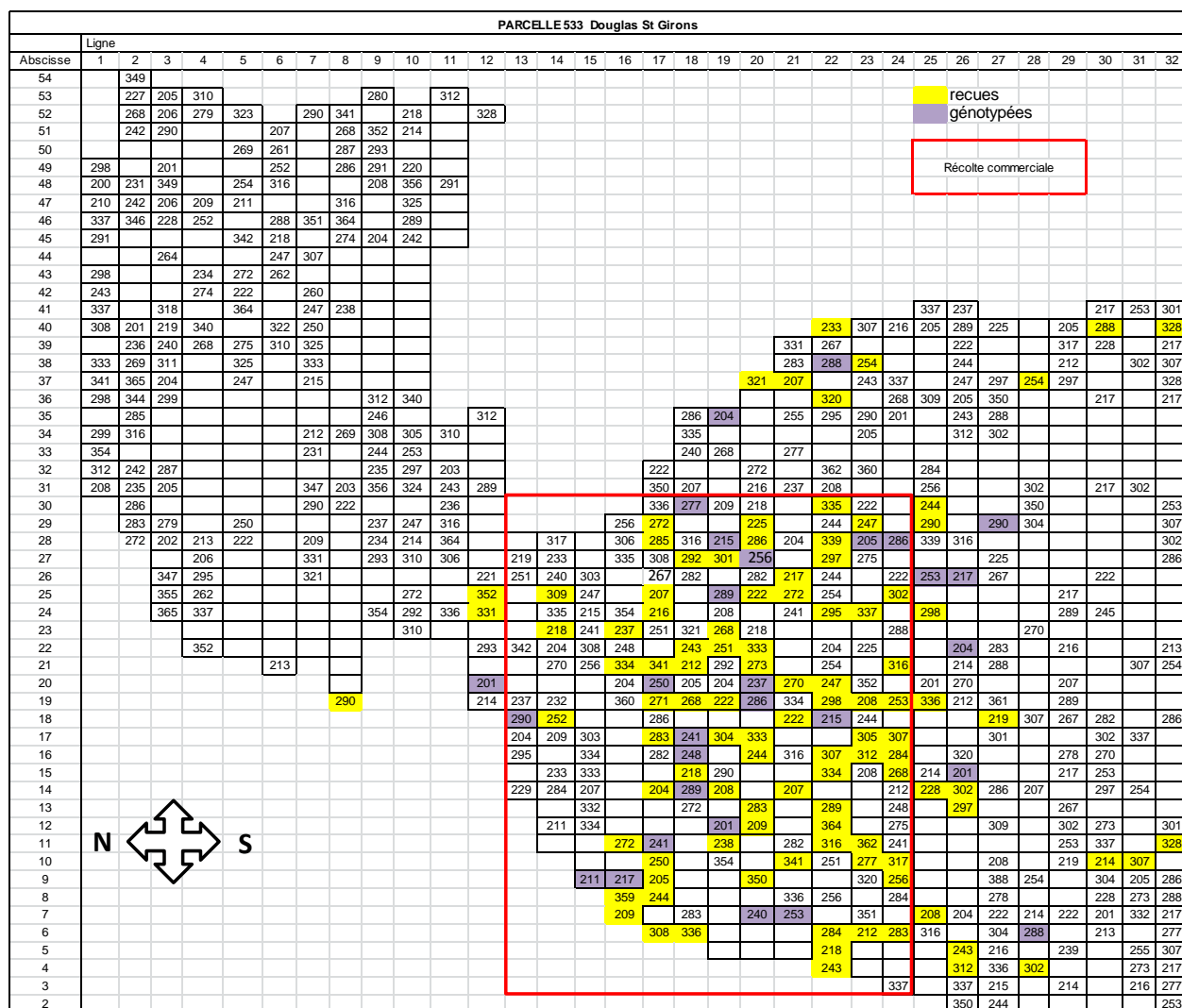
WANG, X. R., LINDGREN, D., SZMIDT, A. E. & YAZDANI, R. (1991). Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. *Scandinavian Journal of Forest Research* 6, 379-385.

WHEELER, N. & JECH, K. (1986). Pollen contamination in a mature Douglas-fir seed orchard. In *Proc. IUFRO conference on Breeding theory, progeny testing and seed orchards*, pp. 160-171, Williamsburg, Oct 13-17, Virginia.

YAZDANI, R. & LINDGREN, D. (1991). Variation of Pollen Contamination in a Scots Pine Seed Orchard. *Silvae Genetica* 40, 243-246.

YAZDANI, R., LINDGREN, D., SEYEDYAZDANI, F., PASCUAL, L. & ERIKSSON, U. (1995). Flowering, phenology, empty seeds and pollen contamination in a clonal seed orchard of *Pinus sylvestris* in northern Sweden. In *Population genetics and genetic conservation of forest trees*. ed. BARADAT, W.T. ADAMS & G. MULLER-STARCK, pp. 309-319. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.

Annexe n° 1 : Plan du verger à graines France2



Annexe n° 2 : Amplification d'ADN avec les marqueurs microsatellites

Mélange PCR (µL) :

	Dmix1				Dmix2			Dmix3			
Marqueurs	2C3	2G12	3B2	3D5	3F1	3G9	4A7	1F9	2C2	4G2	2D4
Tampon QIAGEN	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Amorce R (10µM)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.15	0.5	0.09	0.08	0.55	0.25
Amorce F (10µM)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.15	0.5	0.09	0.08	0.55	0.25
H₂O (qsp 7.4µL)	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.1	1.4	2.22	2.24	1.3	1.9
ADN	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6

Au final, chaque puits de la plaque contient 2.6µL d'ADN et 7.4µL de mix.

Programme PCR (machine Eppendorf) :

- 15 minutes à 95°C
 - 30 secondes à 94°C
 - 1 minute à 56°C
 - 45 secondes à 72°C
 - 10 minutes à 60°C
 - 10°C infini
- } x 30