

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
LABORATOIRE UAGPF - CGAF

THÈSE présentée par :
Pascal ASPE

soutenue le : 10 Juillet 2009

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie Forestière

**Dynamique de la régénération naturelle chez
le pin sylvestre, *Pinus sylvestris* L. : impacts
de la structure des peuplements et des flux
de gènes à différentes échelles spatiales sur
la diversité génétique**

THÈSE dirigée par :

Mme Catherine BASTIEN
Mme Brigitte MUSCH

Directrice de recherche, INRA Orléans
Directrice de laboratoire, CGAF Orléans co-directrice

RAPPORTEURS :

M François LEFEVRE Directeur de recherche, INRA Avignon
Mme Nathalie FRASCARIA-LACOSTE Maître de Conférences, Université Paris Sud-XI

JURY:

M Franck Brignolas	Professeur, Université Orléans
M Thomas CORDONNIER	Ingénieur-chercheur, Cemagref Grenoble
M Jean-François DHOTE	Chef département recherche et développement, ONF
Mme Nathalie FRASCARIA-LACOSTE	Maître de Conférences, Université Paris Sud
M François LEFEVRE	Directeur de recherche, INRA Avignon
Mme Catherine BASTIEN	Directrice de recherche, INRA Orléans
Mme Brigitte MUSCH	Directrice de laboratoire, CGAF Orléans

Table des matières

Liste des sigles et abréviations utilisées i

CHAPITRE I : GESTION FORESTIERE ET DYNAMIQUE DE LA DIVERSITE GENETIQUE EN REGENERATION NATURELLE : ETAT DE L'ART 1

1. PARTICULARITES DES POPULATIONS D'ARBRES FORESTIERS ET DE LEUR GESTION 1	
1.1 <i>Particularités biologiques et génétiques des populations forestières</i> 2	
1.1.1 Des populations de grande taille 2	
1.1.2 Une grande longévité 3	
1.1.3 Un régime de reproduction préférentiellement allogame 4	
1.1.4 Des capacités de migration élevées 5	
1.1.5 Une forte sélection diversifiante 5	
1.2 <i>Gestion forestière et diversité génétique</i> 6	
1.2.1 Un enjeu économique et écologique 6	
1.2.2 Une volonté politique de conservation 7	
1.2.3 ...mais une prise en compte de la diversité génétique encore insuffisante dans la gestion forestière 8	
1.3 <i>Une gestion qui s'inscrit dans le temps</i> 9	
1.4 <i>Une gestion à différentes échelles spatiales</i> 10	
2. DISPERSION DU POLLEN ET QUALITE GENETIQUE DE LA GRAINE CHEZ LES ESPECES ANEMOPHILES 11	
2.1 <i>Paramètres descriptifs et déterminants des flux de pollen</i> 11	
2.1.1 Paramètres descriptifs 11	
2.1.2 Les vergers à graines : des peuplements de référence pour l'étude des déterminants des flux de pollen 12	
2.1.2.1. Des taux de contamination variables et des causes multiples 13	
2.1.2.2. Une taille efficace réduite par rapport à la taille potentielle de la population reproductrice 15	
2.1.2.3. Un grand nombre de pères différents pollinisant chaque arbre mère 16	
2.1.2.4. De faibles taux d'autofécondation 17	
2.1.2.5. Une forte variabilité des contributions polliniques des reproducteurs, des causes multiples 18	
2.1.2.6. De fortes variations inter annuelles de fertilités mâle et femelle 20	
2.2 <i>Comment extrapolier les connaissances acquises en verger à graines aux peuplements forestiers de production ?</i> 21	
2.2.1 Immigration, pool génétique et performances adaptatives 21	
2.2.2 Conséquences du choix des reproducteurs sur la taille efficace de la population à renouveler 23	
2.2.3 Sylviculture à l'échelle de l'unité de gestion et régime de reproduction 24	
2.2.4 Structure du peuplement, autofécondation et consanguinité 24	
2.2.5 Variabilité du succès reproducteur mâle en peuplements forestiers 27	
2.3 <i>Bilan sur les flux de pollen</i> 27	
3. DISPERSION DES GRAINES CHEZ LES ESPECES ANEMOCHORES 28	
3.1 <i>Paramètres descriptifs des flux de graines</i> 29	
3.2 <i>Flux de graines observés en peuplements forestiers</i> 30	
3.2.1 Une dispersion principalement à courte distance 30	
3.2.2 Une dispersion à longue distance difficile à décrire 30	
3.2.3 Une faible variabilité génétique pour la capacité de dispersion 31	

3.2.4 Une anisotropie de dispersion difficile à mettre en évidence.....	32
3.2.5 Influence de la structure du peuplement sur la dispersion des graines.....	32
3.2.6 Une forte variabilité inter annuelle de la dispersion à longue distance	33
3.3 Bilan sur les flux de graines	33
4. OPTIMISER LA GESTION DE LA DIVERSITE GENETIQUE LORS DE L'ETAPE DE REGENERATION NATURELLE : CAS DU PIN SYLVESTRE	35
4.1 Le pin sylvestre : une aire naturelle fragmentée en France	35
4.2 Le pin sylvestre : une espèce largement utilisée en reboisement.....	36
4.3 L'action du gestionnaire.....	37
4.4 Objectifs de la thèse.....	38
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	41
1. LES SITES EXPERIMENTAUX.....	41
1.1 Le pin sylvestre du massif de Haguenau.....	41
1.1.1 Présentation du site expérimental	41
1.1.2 Objectifs des études	42
1.1.3 Matériel végétal	43
1.1.4 Observations réalisées sur le matériel végétal	45
1.1.4.1. Description de la variabilité phénotypique pour différents caractères	45
1.1.4.2. Mesure de la diversité génétique neutre à l'aide de marqueurs moléculaires	46
* <i>Mise au point d'une méthode originale d'extraction d'ADN à partir de cambium.....</i>	46
* <i>Génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites</i>	47
1.2 Les peuplements mélangés chêne-pin en forêt d'Orléans.....	48
1.2.1 Présentation du site expérimental	48
1.2.2 Objectifs des études	50
1.2.3 Géoréférencement et caractérisation de la population d'arbres reproducteurs.....	50
1.2.4 Dispositifs de piégeage de graines.....	51
1.2.5 Caractérisation de l'environnement des pièges à graines.....	52
1.2.6 Etude de la régénération naturelle.....	52
2. ANALYSE DES DONNEES RECUEILLIES	53
2.1 Analyse des données moléculaires.....	53
2.1.1 Descripteurs de la diversité génétique	53
2.1.2 Différentiation génétique des nuages polliniques	54
2.1.3 Apparentement génétique des nuages polliniques	55
2.1.4 Caractérisation du régime de reproduction	57
2.1.5 Analyses de paternité.....	58
2.1.6 Analyses de maternité.....	61
2.2 Etude de la structuration spatiale de la diversité génétique (sites de Haguenau et Orléans)	61
2.2.1 Structuration spatiale de la diversité génétique neutre.....	61
2.2.2 Structuration spatiale de données phénotypiques	62

CHAPITRE III :CARACTERISATION DU PEUPLEMENT REPRODUCTEUR : CAPACITES REPRODUCTRICES, DIVERSITE GENETIQUE ET STRUCTURATION SPATIALE	65
1. RAPPEL DES MATERIELS ET METHODES UTILISEES	66
2. VARIABILITE DES CAPACITES REPRODUCTRICES.....	66
2.1 <i>Phénologie de la floraison : variabilités individuelle et inter-annuelle</i>	66
2.2 <i>Floribondités mâle et femelle : variabilités individuelle et inter-annuelle</i>	67
2.3 <i>Fructification et capacité de production de graines.....</i>	68
2.3.1 Variabilité observée à Haguenau pour la fructification et la production de graines.....	69
2.3.2 Variabilité observée en forêt d'Orléans pour la fructification et la production de graines.....	69
2.4 <i>Discussion : variabilité pour les capacités reproductrices</i>	70
3. DIVERSITE GENETIQUE NEUTRE DU PEUPLEMENT REPRODUCTEUR EN FORET DE HAGUENAU.....	72
3.1 <i>Diversité neutre estimée à l'aide de microsatellites nucléaires...</i>	72
3.2 <i>...et diversité génétique neutre estimée à l'aide de microsatellites chloroplastiques.....</i>	73
3.3 <i>Impact de la tempête de 1999 sur le niveau de diversité génétique neutre.....</i>	73
3.4 <i>Comparaison avec la diversité génétique observée au niveau du massif.....</i>	74
3.5 <i>Discussion.....</i>	74
4. STRUCTURATION SPATIALE AU SEIN DU PEUPLEMENT REPRODUCTEUR	76
4.1 <i>Une quasi-absence de structuration spatiale des caractéristiques de floraison.....</i>	76
4.2 <i>Une structuration spatiale de la production de graines liée à la densité locale de reproducteurs</i>	77
4.3 <i>Structuration spatiale de la diversité génétique neutre</i>	77
4.3.1 Mise en évidence d'une structuration spatiale de la diversité génétique à l'aide de microsatellites nucléaires	77
4.3.2 Aucune structuration spatiale de la diversité génétique décrite à l'aide de microsatellites chloroplastiques ..	78
4.4 <i>Discussion :</i>	78
4.4.1 Une structuration spatiale à différents niveaux	78
4.4.2 Importance de l'environnement sur la production de graines	80
5. CONCLUSION	81
CHAPITRE IV : DISPERSION DU POLLEN : DE L'UNITE DE GESTION A L'UNITE DE REPRODUCTION.....	83
1. RAPPEL DES MATERIELS ET METHODES UTILISES	83
2. CARACTERISATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE DANS LES DESCENDANCES MATERNELLES ISSUES DE POLLINISATION LIBRE.....	84
2.1 <i>Caractérisation de la diversité génétique des graines à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires</i>	84
2.2 <i>Caractérisation de la diversité génétique des graines à l'aide de marqueurs microsatellites d'origine paternelle.....</i>	84
2.3 <i>Diversité génétique des descendances et caractéristiques du voisinage reproducteur</i>	85
2.4 <i>Discussion.....</i>	86
3. DETECTION DE DIFFERENCIATIONS DES NUAGES POLLINIQUES.....	88
3.1 <i>Niveau de différenciation avec les deux types de marqueurs</i>	88

3.2 Différenciation des nuages polliniques et caractéristiques des arbres mères.....	89
3.3 Comparaison des nuages polliniques à l'aide de corrélation de paternité	90
4. ESTIMATION DES DISTANCES DE DISPERSION DU POLLEN PAR ANALYSE DE PATERNITE.....	92
4.1 A l'aide de microsatellites nucléaires.....	92
4.2 A l'aide de microsatellites chloroplastiques.....	93
4.3 A l'aide des deux types de marqueurs	93
5. TAUX D'IMMIGRATION DE POLLEN ET CARACTERISTIQUES DE VOISINAGE.....	94
6. CONCLUSION	96
CHAPITRE V : MISE EN REGENERATION DU PEUPLEMENT REPRODUCTEUR : DE LA DISPERSION DES GRAINES A LA DIVERSITE GENETIQUE DES SEMIS	98
1. DISPERSION DES GRAINES EN PEUPLEMENT MELANGE ET INFLUENCE DE LA STRUCTURE SPATIALE DES REPRODUCTEURS SUR LA MISE EN PLACE DE LA REGENERATION NATURELLE.....	98
1.1 Contexte général de l'article	98
1.2 Les peuplements mélangés : un contexte particulier	99
1.3 Impacts of reproductive stand structure on spatial patterns of Scots pine seed dispersal: consequences for forest practices.....	100
2. ETUDE DE LA STRUCTURE GENETIQUE D'UNE JEUNE REGENERATION NATURELLE DANS LE SITE DE HAGUENAU.....	119
2.1 Objectifs de l'étude.....	119
2.2 Diversité génétique chez de jeunes semis de pin sylvestre issus d'un même évènement de dispersion	120
2.3 Evolution démographique et génétique de jeunes semis issus de régénération naturelle entre 1 et 4 ans	123
2.4 Analyses de maternité sur semis	125
CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE – PERSPECTIVES	128
1. BILAN DES CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE REGIME DE REPRODUCTION DU PIN SYLVESTRE DANS DEUX TYPES DE PEUPLEMENTS FORESTIERS CONTRASTES	128
1.1 Une unité de reproduction à caractériser à différentes échelles.....	128
1.2 Compléter l'étude du régime de reproduction dans des situations de peuplements fragmentés	130
1.3 Gestion de la diversité neutre et de la diversité adaptative	133
2. CONSEILS POUR UNE GESTION DE LA DIVERSITE GENETIQUE DU PIN SYLVESTRE CONDUIT EN REGENERATION NATURELLE	134
2.1 Dresser l'état des lieux du peuplement : qualité phénotypique, diversité génétique et voisinage reproducteur.....	134
2.2 La sélection des arbres semenciers	138
2.3 Dispersion des graines et stratégies de régénération.....	139
2.4 Travail du sol et mise en place de la régénération.....	140
BIBLIOGRAPHIE.....	142
ANNEXES	174

Sigles et abréviations

CGAF : Conservatoire Génétique des Arbres forestiers de l'ONF

CRGF : Commission des Ressources Génétiques Forestières

DGPAAT : Direction Générale des Politiques Agricole, Agroalimentaire, et des Territoires

EUFORGEN : European Forest Genetic Resources Program

FD : Forêt domaniale

IDF : Institut pour le Développement Forestier

IFN : Institut Forestier National

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

MFR : Matériel Forestier de Reproduction

ONF : Office National des Forêts

PAF : Plan d'Action Forêts

PFN : Programme Forestier National

UC : Unité Conservatoire *in situ*

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMOVA : Analyse moléculaire de variance

ANOVA : Analyse de variance

A : Nombre d'allèles par locus

A_{5%} : Nombre d'allèles de fréquence supérieure à 5%

Ae : Nombre d'allèles efficaces

Ap : Nombre d'allèles privés

AFF : Abondance de floraison femelle

AFM : Abondance de floraison mâle

CV : Coefficient de variation

Δ : Différence de LOD score entre les deux individus ayant la plus grande vraisemblance

DBH : Diamètre moyen à 1,30 m

D5 : Distance moyenne aux 5 pins adultes les plus proches

D10 : Distance moyenne aux 10 pins adultes les plus proches

D15 : Distance moyenne aux 15 pins adultes les plus proches

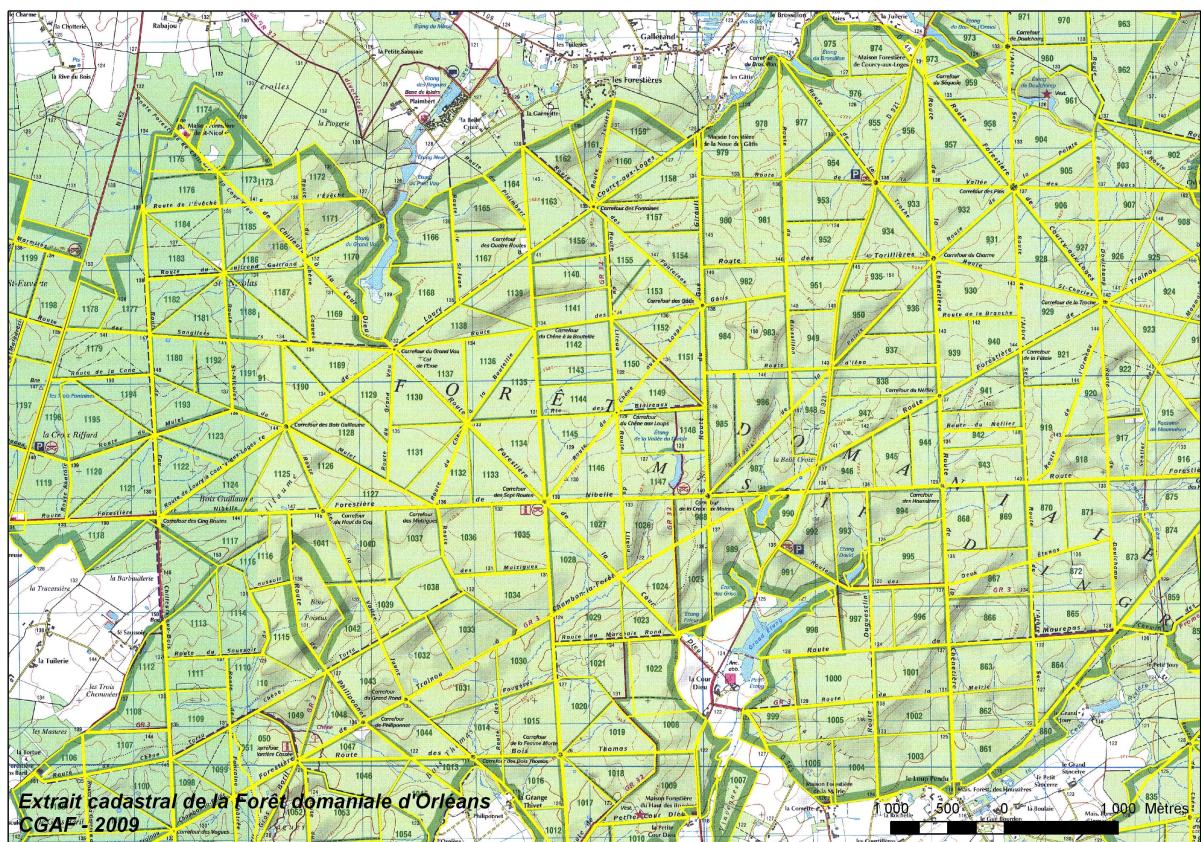
D30 : Distance moyenne aux 30 pins adultes les plus proches

Dmin : Distance au pin adulte le plus proche

- EP : Probabilité d'exclusion multilocus**
- F_I : Coefficient de consanguinité de Wright**
- F_{ij} : Coefficient d'apparentement de Loiselle**
- F_{is} : Déficit en hétérozygotes**
- F_{st} : Index de fixation entre sites**
- F_s : Coefficient moyen d'apparentement**
- H₁ : Nombre d'haplotypes uniques**
- H_{5%} : Nombre d'haplotypes de fréquence supérieure à 5%**
- He : Hétérozygotie attendue**
- H_{eff} : nombre d'haplotypes efficaces**
- H_o : Hétérozygotie observée**
- H_p : Nombre d'haplotypes privés**
- H_s : Diversité haplotypique**
- LOD score : Logarithme décimal du rapport entre la vraisemblance de la liaison génétique entre deux loci et la vraisemblance de l'absence de liaison, calculé pour une distance génétique donnée**
- N₁₀ : Nombre de pins adultes dans un rayon de 10m**
- N₁₅ : Nombre de pins adultes dans un rayon de 15m**
- N₂₀ : Nombre de pins adultes dans un rayon de 20m**
- N₃₀ : Nombre de pins adultes dans un rayon de 30m**
- N₅₀ : Nombre de pins adultes dans un rayon de 50m**
- N_b : taille de voisinage (au sens de Wright)**
- N_{ep} : Nombre efficace de pères**
- N_{ep₂₀} : Nombre efficace de pères pour 20 graines**
- N_h : Nombre d'haplotypes**
- N_p : Nombre d'haplotypes différents observés**
- p_b : Paire de bases**
- φ_{FT} (PhiFT) : Coefficient de différenciation génétique (approche TwoGener)**
- r_m : Coefficient d'autocorrélation de Mantel**
- r_{spearman} : Coefficient de corrélation de Spearman**
- r_p : 'Correlated paternity'**
- r_{pm} : Proportion de plein-frères parmi les descendants issus d'allofécondation**
- SGS : Structuration génétique spatiale**
- SMM : Stepwise mutation model**
- t_m : taux d'allo fécondation multilocus**
- t_s : taux d'allo fécondation simple locus**

Chapitre I

Gestion forestière et dynamique de la diversité génétique en régénération naturelle : état de l'art



Chapitre I : Gestion forestière et dynamique de la diversité génétique en régénération naturelle : état de l'art

1. Particularités des populations d'arbres forestiers et de leur gestion.

La génétique des populations s'intéresse à la mesure de la diversité génétique entre populations, à la structurale spatiale de cette diversité à différentes échelles, aux modes de transmission de cette diversité d'une génération à l'autre et aux processus qui affectent cette évolution d'une génération à l'autre. Les modèles développés permettent ainsi de prédire ou de retracer la trajectoire évolutive de populations en prenant en compte les différents processus qui peuvent modifier cette trajectoire mais aussi d'estimer la viabilité à long terme de ces populations. Les principaux processus permettant d'expliquer l'évolution génétique des populations sont le régime de reproduction entre individus et les différentes forces évolutives (dérive, mutation, migration et sélection) qu'elles subissent.

Si on compare cycle sylvigénésique et cycle sylvicole (**Figure I.1**), on observe que la gestion forestière se traduit d'abord par un raccourcissement du cycle naturel des populations d'arbres forestiers afin de diminuer le temps nécessaire à la production d'individus considérés comme aptes à être récoltés. Cette gestion affecte également la composition des populations, leur démographie et la répartition spatiale des arbres au cours des opérations sélectives de prélèvements qui se succèdent tout au long d'un cycle sylvicole. Elle modifie donc nécessairement la dynamique naturelle des populations d'arbres forestiers et pourtant elle évalue très rarement l'impact de ces interventions d'un point de vue génétique. Prendre en compte l'évolution génétique d'une population d'une génération à l'autre est essentiel car cette évolution conditionne fortement les capacités d'adaptation des populations sur le long terme. Cette préoccupation est d'autant plus importante que les changements environnementaux en cours vont exercer des contraintes biotiques et abiotiques sur les populations d'arbres qui seront ainsi confrontées à de nouvelles conditions environnementales à un rythme accéléré. Leurs capacités d'adaptation à ces changements sont notamment dépendantes de leurs caractéristiques génétiques. Une gestion forestière qui tendrait, dans ce contexte environnemental fluctuant, à maintenir les objectifs actuellement assignés aux massifs forestiers (dont celui de production) ne peut plus faire l'économie de la prise en

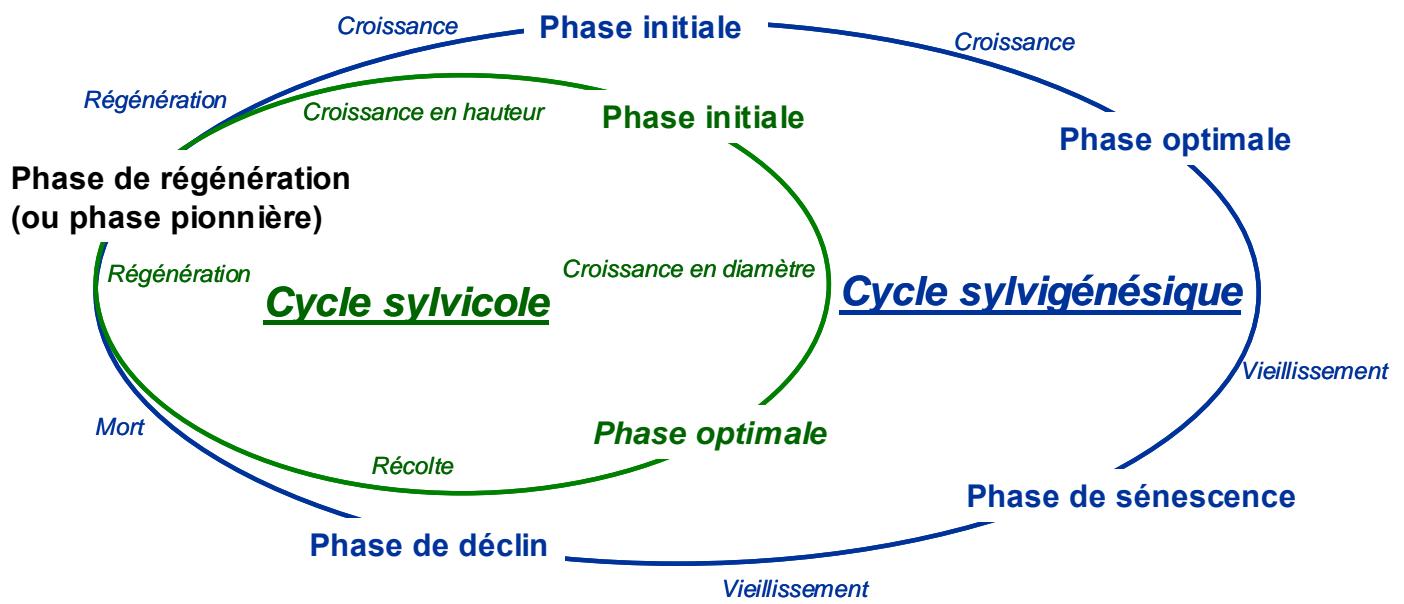


Figure I.1 : Les différentes étapes des cycles sylvicole et sylvigénésique. En raccourcissant le cycle naturel, la gestion forestière modifie le fonctionnement de l'écosystème forestier et la dynamique de la diversité. Alors que la diversité spécifique est largement étudiée et prise en compte par la création d'îlots de vieillissement, la diversité génétique reste relativement peu prise en compte. .

compte de la diversité génétique et de son évolution au cours des différentes étapes du cycle sylvicole.

Pour bien comprendre le fonctionnement et la dynamique génétique des populations d'arbres forestiers, il faut avant tout savoir décrire ces populations et comprendre comment elles sont affectées par la gestion forestière. Pour cela, il est nécessaire :

- i) De connaître les caractéristiques génétiques des populations forestières ;
- ii) De définir les différentes échelles spatiales et temporelles auxquelles la gestion intervient ;
- iii) De mesurer l'impact de cette gestion sur les différents processus de la dynamique forestière et sur les ressources génétiques.

1.1 Particularités biologiques et génétiques des populations forestières

Les arbres forestiers présentent une diversité génétique élevée et supérieure à celle de n'importe quel autre groupe taxonomique végétal ou animal (Hamrick et al., 1992 ; Müller-Starck, 1995). Des études comparatives entre plantes herbacées, arbustes et arbres forestiers montrent clairement que ces derniers conservent la majeure partie de la diversité à l'intérieur des espèces et des populations (Hamrick et Godt, 1989 ; Nybom, 2004). Il en découle que les populations d'arbres sont d'une manière générale moins structurées et moins différenciées sur le plan génétique que les plantes herbacées. Si on considère l'ensemble des facteurs et des processus qui contribuent à maintenir une diversité génétique élevée dans les populations et à l'échelle individuelle, on peut constater qu'un grand nombre de ces critères se retrouve chez les arbres forestiers.

1.1.1 Des populations de grande taille

D'un point de vue strictement démographique, les arbres forestiers se caractérisent par de grandes tailles de population allant parfois jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'individus étant données les grandes surfaces occupées par les peuplements forestiers. Ce grand nombre potentiel d'individus réduit le risque de perte de diversité génétique par dérive, qui engendrerait une diminution de la diversité intra population et une augmentation de la différenciation inter population. Dans une revue bibliographique sur la diversité d'allozymes chez les arbres forestiers, Hamrick et al (1992) montrent que la taille de l'aire de répartition d'une espèce est le meilleur prédicteur du taux de diversité génétique intra population. Les

espèces aux aires les plus grandes et avec un régime de reproduction allogame présentent ainsi un niveau de diversité intra population quatre fois plus élevé que des espèces endémiques qui subsistent dans des peuplements relativement isolés et un quart seulement de la diversité totale mesurée correspond à de la diversité entre populations.

Il convient cependant de souligner les impacts majeurs des évènements de recolonisation post-glaciaire sur l'organisation actuelle de la diversité génétique de nombreuses espèces. Ces évènements de recolonisation se sont parfois faits à partir d'un nombre limité d'individus issus de zones refuges. Ils expliquent ainsi comment certaines espèces à large aire actuelle de répartition possèdent une diversité génétique très faible. Tel est le cas par exemple pour *Pinus resinosa* et *Pinus torreyana* (Mosseler et al., 1991 ; Ledig et Conkle, 1983). Ainsi, lorsqu'au cours de son histoire évolutive une espèce subit un goulot d'étranglement ('bottleneck') extrêmement fort, l'impact de celui-ci sur la diversité génétique subsiste durant de nombreuses générations puisque la seule source d'allèles nouveaux devient alors la mutation ou l'hybridation avec une espèce proche.

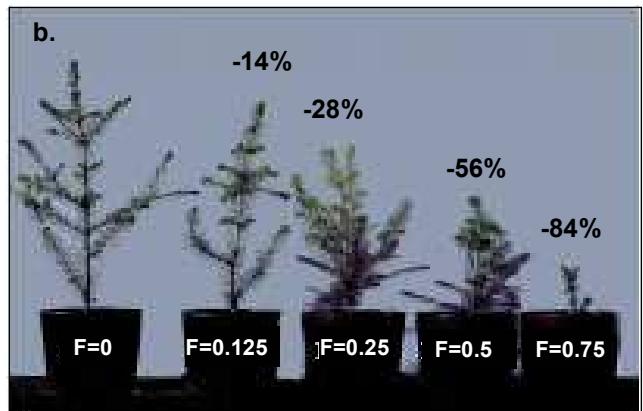
1.1.2 Une grande longévité

Les arbres possèdent une longévité élevée ainsi qu'un âge de fécondité relativement avancé. Il en découle la possibilité i) de réduire considérablement les effets de fondation durant les événements de colonisation et ii) de pouvoir se reproduire sur de nombreuses années et donc de voir leur renouvellement être moins dépendant d'aléas climatiques annuels.

En raison d'une maturité sexuelle tardive des individus, la fondation d'une nouvelle population dépend pendant de nombreuses années uniquement de l'arrivée de nouveaux migrants via les flux de graines et non pas d'évènements de reproduction intra population. Le nombre d'individus qui participent à l'événement de fondation peut ainsi, par migration, continuer à augmenter avant que n'interviennent d'éventuels évènements de recombinaison intra population entre individus devenus florifères. La population ainsi parvenue à maturité sexuelle est alors composée de cohortes successives, ce qui favorise le maintien de la diversité génétique (Austerlitz et al., 2000). Leur grande longévité confère aux arbres forestiers la possibilité de connaître des années de très faible recrutement sans pour autant que cela affecte leur dynamique démographique. Cette forte plasticité leur permet d'être ainsi moins dépendants des conditions climatiques et peut expliquer les larges aires de répartition qu'occupent de nombreuses espèces.

Groupe	Nombre d'espèces étudiées	t	
		Médiane	Gamme
<i>Pinus</i>	17	0.9	0,41 - 1
<i>Picea</i>	7	0.84	0,08 - 0,91
<i>Eucalyptus</i>	12	0.77	0,59 - 0,84
Angiospermes tropicaux	13	0.94	0,46 - 1

Tableau I.1 : Estimation des taux d'allofécondation (t) chez quatre groupes d'arbres forestiers (d'après White et al., 2007b)



Espèces (verger)	Caractère amélioré	Gain attendu	Référence
Pin sylvestre Haguenau (PSY-VG-003)	Croissance	+2%	Bastien, comm. personnelle
Pin maritime (PPA-VG-007)	Volume	+30%	Alazard & Raffin, 2002
Douglas (Washington 2)	Hauteur	+12%	Ministère de l'agriculture, 2007

Figure I.2 : Conséquences de la dépression de consanguinité sur la croissance et la survie d'arbres forestiers.

- (a) Plantation de Douglas de 33 ans. Les individus au centre sont issus d'autofécondation, ceux sur les côtés de croisements entre individus non apparentés. La survie des individus autofécondés diminue de plus de 60% par rapport aux témoins, leur diamètre de 40% (Sorensen in White et al., 2007b).
- (b) Impacts de différents niveaux de consanguinité (F) sur la croissance juvénile de l'Epicéa commun. F=0.5 correspond à des autofécondations. Les pourcentages indiquent la perte en volume à l'âge adulte par rapport à un croisement entre individus non apparentés (Eriksson et al., 2006)
- (c) Les gains génétiques attendus par l'utilisation de matériel amélioré issu des programmes de sélection sont donnés comparé à la dépression de consanguinité relative estimée dans les deux exemples ci-dessus.

Cette forte longévité, associée à une grande taille, augmente le risque d'accumuler des mutations en comparaison aux petites plantes à cycle de vie court (Ledig, 1986). En effet, plus un individu est âgé, plus le nombre de divisions cellulaires est grand, et plus le risque d'accumuler des erreurs de copie durant la mitose est élevé. En se basant sur l'ensemble des études portant sur la fréquence d'apparition d'individus chlorophylle déficients (mutation létale), White et al. (2007a) mettent en évidence une fréquence d'apparition de la mutation 10 fois plus élevée chez les arbres que chez les espèces annuelles.

1.1.3 Un régime de reproduction préférentiellement allogame

La plupart des arbres forestiers ont un régime de reproduction allogame. Les taux d'allofécondation, bien que variables selon les espèces, les individus et les situations environnementales, sont généralement proches de 80% (**Tableau I.1**). D'après Petit et Hampe (2006), cette adéquation entre forme de vie et régime de reproduction peut trouver son origine dans les conséquences de mécanismes tels que la dépression de consanguinité, l'auto incompatibilité et la dioécie. En effet, d'un point de vue évolutif, une espèce à longue durée de vie ne trouve pas d'avantage à un régime de reproduction autogame puisque un échec de reproduction une année donné n'affecte que très peu la fitness des individus à long terme et la dynamique démographique de l'espèce. De plus, la dépression de consanguinité constitue un moyen efficace pour limiter l'autofécondation et le risque d'accumulation de mutations délétères, plus fréquentes chez les individus de grande taille et à forte longévité (Ledig, 1986 ; White et al., 2007a). Les conséquences de la dépression de consanguinité peuvent apparaître plus ou moins tôt selon les espèces : alors que chez le pin sylvestre, le filtre de consanguinité apparaît très tôt dès la formation et le développement du zygote dans la graine, engendrant l'avortement de l'embryon (graine vide) (Sarvas, 1962), chez d'autres espèces comme le sapin pectiné, ce filtre apparaît beaucoup plus tardivement, au niveau de la survie de la plantule germée et de son développement (Restoux 2009). Outre la production de graines viables et la survie des plantules, une augmentation du niveau de consanguinité va également affecter négativement la vigueur des individus et ce dans des proportions parfois très importantes (**Figure I.2**). Ces pertes de croissance potentielles sont généralement ignorées par les gestionnaires forestiers alors que leur ampleur peut dépasser très largement les gains qu'ils espèrent de l'utilisation de variétés forestières issues de programmes d'amélioration génétique.

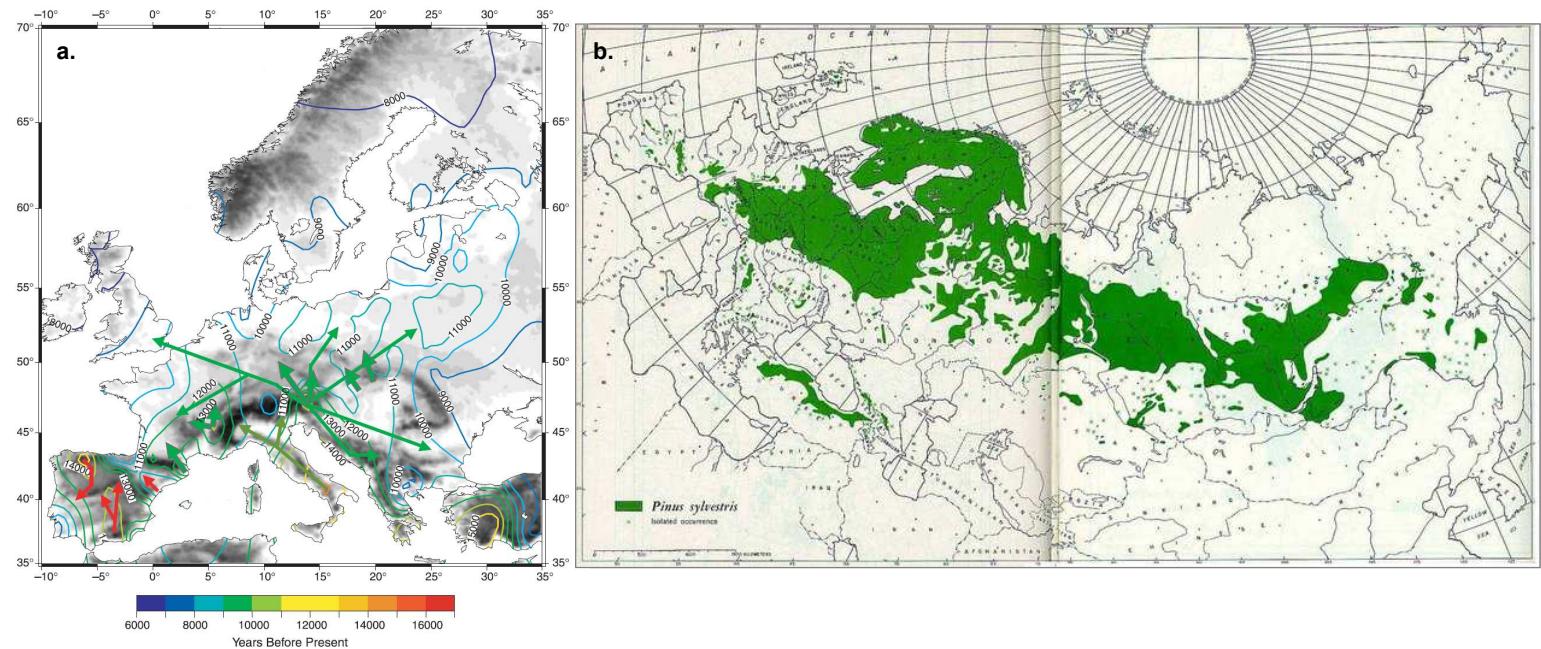


Figure I.3 : (a) Routes de migration post-glaciaire du pin sylvestre. Les couleurs des flèches correspondent aux 4 haplotypes mitochondriaux détectés dans les populations actuelles. Les isocontours sont définis à partir de dates de recolonisation estimées. (Cheddadi et al, 2006)

(b) Carte de l'aire de répartition naturelle actuelle du pin sylvestre (Critchfield et Little, 1966)

L'ensemble des processus évoqués ci-dessus (allogamie préférentielle, forte dépression de consanguinité), couplés à une grande longévité, permettent de maintenir au sein des populations d'arbres forestiers un taux d'hétérozygotie élevé, synonyme de diversité génétique.

1.1.4 Des capacités de migration élevées

Les approches phylogéographiques permettent d'explorer les capacités de migration des individus de différentes espèces forestières. Il y a 18000 ans, la plupart des espèces des forêts tempérées étaient généralement confinées dans les parties les plus méridionales de leur aire de répartition actuelle (**Figure I.3** ; Cheddadi et al., 2006 ; Le Corre et al., 1997b). La recolonisation des latitudes plus élevées a eu lieu en quelques dizaines ou centaines de générations (Huntley et Birks, 1983 ; Webb, 1985 ; Huntley, 1990) et de nombreuses études ont montré que des recolonisations rapides n'étaient possibles qu'à partir d'événements de dispersion à longue distance (Skellam, 1951 ; Le Corre et al., 1997b ; Clark, 1998). En modélisant différents scénarios de dispersion des graines, Austerlitz et Garnier-Géré (2003) aboutissent à la conclusion que seuls des événements de dispersion à 20 ou 50km de distance peuvent expliquer les vitesses de recolonisation observées en Europe. A titre d'exemple, Le Corre (1997b) estime à environ 500m/an la vitesse d'extension de l'aire de distribution des chênes suite aux événements post-glaciaires. Mais le meilleur modèle pour expliquer cette extension de l'aire de distribution semble être l'existence d'événements de dispersion à longue voire très longue distance et pas seulement une vitesse de dispersion moyenne (Clark, 1998).

1.1.5 Une forte sélection diversifiante

Les arbres sont exposés à des conditions biotiques et abiotiques très variables aussi bien au niveau individuel au cours de leur vie, qu'au niveau spécifique sur l'ensemble de leur aire de répartition. Ces conditions très différentes peuvent entraîner des pressions de sélection variables à tous les stades de développement (gamète, graine, semis, juvénile, adulte). Bien que ces conditions ne soient pas spécifiques aux arbres forestiers, la variabilité des pressions de sélection (amplitude, sens, caractère-cible) est augmentée par leur longue durée de vie et par la diversité des organismes avec lesquels ils interagissent (Linhart et Grant, 1996).



Figure I.4 : Plantation monoclonale de peupliers réalisée avec le cultivar 'Beaupré'. Ce cultivar immun vis-à-vis des populations de rouille à *Melampsora larici-populina* jusqu'en 1994 s'est révélé très sensible aux populations de l'agent pathogène lors de l'émergence de la virulence7 chez cet agent pathogène. Lors d'une épidémie de rouille, l'ensemble des individus est touché et incapable de résister au champignon, engendrant des pertes de croissance pouvant atteindre 30 à 40% chaque année (Source INRA).



Figure I.5 : Exemple d'adaptation locale chez l'Epicéa de Sitka. Les individus sont rangés de gauche à droite selon un gradient latitudinal d'origine allant de la Californie au Canada. Le lieu de plantation se situe en Californie. Plus la différence entre lieu d'origine et lieu de plantation est élevée, moins les individus sont vigoureux, montrant une meilleure adaptation des individus à leur latitude d'origine.

L'ensemble de ces facteurs entraîne une succession complexe de différentes formes de sélection (fréquence-dépendante, sélection balancée,...) qui contribuent à maintenir la diversité génétique (Petit et Hampe, 2006).

1.2 Gestion forestière et diversité génétique

1.2.1 *Un enjeu économique et écologique*

La nécessité de maintenir une diversité génétique suffisante afin de garantir les capacités évolutives des espèces et la résilience des écosystèmes n'est plus à démontrer aujourd'hui. En foresterie, les plantations monoclonales constituent un exemple parlant des conséquences parfois désastreuses d'une base génétique très réduite. Lors d'épidémies de ravageurs ou de maladies, les dégâts peuvent être considérables, tous les individus possédant alors le même niveau de sensibilité (**Figure I.4**). A l'opposé l'existence, au sein d'une même espèce, de populations à adaptations spécifiques résultant de différentes pressions de sélection peut être exploitée au plan économique pour tirer profit de cette diversité adaptative locale. C'est ainsi que les délimitations de régions de provenance le long de gradients latitudinaux ont permis de valoriser au mieux la diversité génétique disponible au sein des espèces pour des utilisations en reboisement (**Figure I.5**). Conserver les capacités d'adaptation et d'évolution des espèces constitue donc un enjeu économique et écologique considérable ; cet enjeu est aujourd'hui encore plus élevé avec les changements environnementaux rapides à venir.

Pour chaque espèce, mettre en place une stratégie de conservation passe au préalable par une connaissance de la diversité génétique existante, de sa structuration géographique mais aussi des mécanismes de maintien de cette diversité. Alors que pour les espèces animales ou les plantes cultivées, la conservation des ressources génétiques constitue un enjeu économique reconnu, mais aussi social et culturel notamment au travers des races/variétés locales auxquelles se rattachent des traditions et savoir-faire, pour les populations forestières cet enjeu est essentiellement économique et écologique. Si les programmes d'amélioration développés chez de nombreuses espèces ont eu besoin de cet inventaire pour exploiter la diversité génétique disponible et obtenir des gains significatifs sur des critères d'intérêt économiques, l'inventaire de diversité réalisé n'a été souvent que partiel. La diversité génétique des populations actuelles représente dans leur intégralité, la seule source de gènes potentiellement utiles pour l'avenir. Maintenir cette diversité permet de garantir l'existence

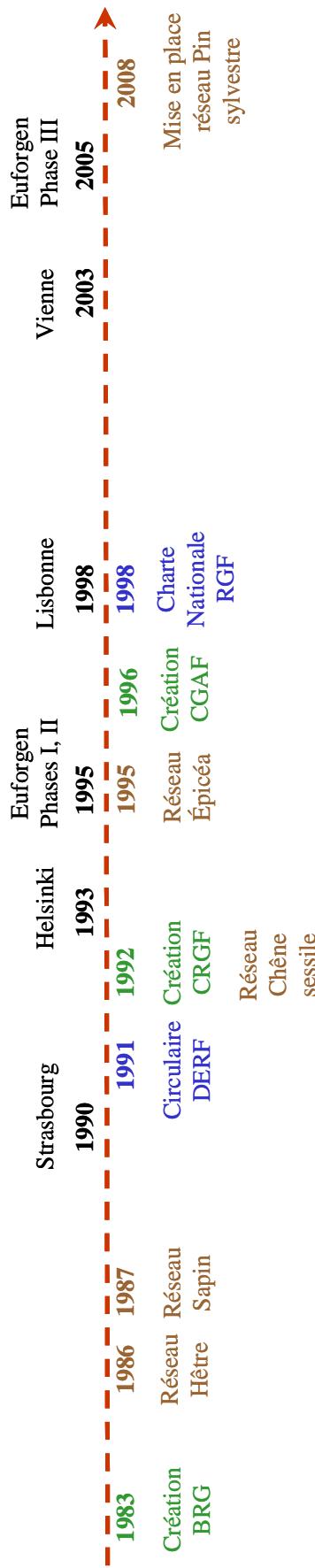


Figure 1.6. Les grandes étapes de la mise en place d'une politique de conservation des ressources génétiques forestières en France (partie inférieure) et au niveau Mondial et Européen (partie supérieure)

de ressources diversifiées, qui bien que non valorisées à l'heure actuelle, sont susceptibles de répondre aux besoins futurs de la sylviculture.

1.2.2 *Une volonté politique de conservation*

Une définition de la gestion durable des forêts a été proposée par la Conférence ministérielle sur la protection des forêts en Europe (Strasbourg, 1990), et a depuis été adoptée par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). La gestion durable des forêts est définie ainsi: « *La gestion durable signifie la gérance et l'utilisation des forêts et des terrains boisés, d'une manière et à une intensité telles qu'elles maintiennent leur diversité biologique, leur productivité, leur capacité de régénération, leur vitalité et leur capacité à satisfaire, actuellement et pour le futur, les fonctions écologiques, économiques et sociales pertinentes, aux niveaux local, national et mondial ; et qu'elles ne causent pas de préjudices à d'autres écosystèmes* ». Pour répondre à ces critères, chaque pays rédige un Programme Forestier National (PFN) en fonction de ses propres objectifs, de ses contraintes économiques, sociales et écologiques et de ses ressources disponibles. Ces programmes favorisent le développement d'un partenariat entre tous les groupes d'intérêt, en mettant l'accent sur la souveraineté des Etats en matière d'aménagement des ressources forestières. Le but est de promouvoir la conservation et l'utilisation durable des ressources forestières afin de répondre aux besoins locaux, nationaux et mondiaux.

La France a mis en place, dès le début des années 1990, une politique nationale de conservation des ressources génétiques des arbres forestiers (circulaire DERF/SDF/N91/N°3011 du 9 septembre 1991), qui s'est révélée en accord avec les engagements européens (Strasbourg, 1990 et Helsinki, 1993) et mondiaux (conférence de Rio, 1992) (**Figure I.6**). Dès les années 1980, des réseaux de conservation *in situ* ont été mis en place pour plusieurs espèces. Cette action s'inscrit dans le cadre de la charte pour la conservation des ressources génétiques des arbres forestiers en France (BRG, 1997). Cette charte prévoit également 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 précisant « *les effets des facteurs [environnementaux susceptibles d'agir] sur l'évolution de la diversité génétique* ». En France, c'est la Commission des Ressources Génétiques Forestières (CRGF) qui organise la création et la mise en place des réseaux de conservation et qui définit les règles de gestion applicables aux unités conservatoires. Au niveau pan européen, la

coordination des actions concrètes de conservation des ressources génétiques est assurée par EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Program) depuis 1994.

Les orientations du PFN Français concernant la biodiversité sont déclinées dans le Plan d’Action Forêt (PAF, 2006) qui définit trois grands axes prioritaires dont la préservation de la biodiversité ordinaire, intra et interspécifique, « *enjeu important au regard de l'évolution des écosystèmes forestiers confrontés au changement climatique et plus généralement aux changements globaux* ». Préserver ces différents niveaux de la diversité biologique nécessite donc non seulement de les caractériser mais aussi de comprendre leur dynamique aussi bien en conditions naturelles que sous action anthropique. La diversité génétique y occupe une place particulière, en particulier dans le point 2.6 du PAF « *Améliorer la prise en compte de la diversité génétique forestière* ».

1.2.3 ...mais une prise en compte de la diversité génétique encore insuffisante dans la gestion forestière

Une récente analyse des principaux documents de l’Office National des Forêts (ONF) pour la prise en compte de la biodiversité dans la gestion forestière concluait que « *si la plupart des documents abordent la biodiversité dans ses composantes interspécifique et écosystémique, la dimension intraspécifique est souvent oubliée et ne fait, le plus souvent, l'objet d'aucun développement au niveau de recommandations. Ce constat est certes en partie imputable au développement récent des connaissances dans le domaine de la génétique des populations chez les arbres forestiers. Il conduit cependant à une segmentation regrettable des actions forestières relatives aux différents niveaux de la biodiversité. Une réunification de ces volets de ce concept apparaît cruciale et urgente* » (Gosselin et Valadon, 2005). En outre, pour les forêts publiques gérées par l’ONF, la mise en œuvre effective des mesures du Plan d’Action Forêt traitant de la diversité génétique passe par une véritable prise en compte de cette composante dans les divers documents cadres nationaux (Directive Nationale d’Aménagement), régionaux (Directives Régionales d’Aménagement, Schémas Régionaux d’Aménagement) et locaux (aménagements forestiers) qui orientent les choix des gestionnaires. Enfin, divers guides techniques mis à disposition des gestionnaires doivent également contribuer à une meilleure prise en compte de la diversité génétique dans la gestion courante des massifs forestiers. Seuls les guides de sylviculture les plus récents, déclinés par espèce et/ou par régions biogéographiques (ex : Chênaie atlantique, Douglasaines, Pineraies de

plaine Ile de France-Nord Ouest,...) commencent à prendre en compte les incidences possibles de la gestion courante sur la diversité génétique.

Il apparaît bien difficile de connaître les causes de ce manque de références à la diversité génétique intraspécifique alors que les programmes forestiers nationaux prévoient explicitement sa prise en compte et que des réseaux de conservation des ressources génétiques existent. La réponse repose peut être sur la difficulté à appréhender cette diversité puisqu'elle demeure peu visible, mais aussi sur le manque de formation et d'information. Geburek et Konrad (2008) mettent en avant les principales causes pouvant expliquer cette lacune, et citent notamment :

- la longévité des cycles forestiers qui ne permettent pas d'avoir le recul temporel nécessaire pour observer les conséquences de divers phénomènes naturels (dérive génétique, consanguinité) ou anthropiques (conséquences de transferts de matériel) ;
- la complexité des structures européennes qui empêchent la mise au point d'une véritable stratégie de conservation commune, notamment en raison des divergences d'intérêt selon les pays (importance de la forêt dans la balance commerciale) ;
- le manque d'intérêt pour la diversité intra-spécifique au niveau du grand public, comparé à l'attention portée à la diversité spécifique.

Des efforts considérables restent donc à réaliser pour une traduction, dans les pratiques de gestion courante, des recommandations nationales et internationales en matière de gestion optimale de la diversité génétique.

1.3 Une gestion qui s'inscrit dans le temps

Pour l'ONF, « *Le rôle des sylvicultures est de faire évoluer les forêts à long terme, en mettant à profit les facteurs écologiques et les potentialités naturelles* ». Pour atteindre cet objectif, la gestion sylvicole est découpée en plusieurs étapes, chacune se faisant avec différents pas de temps. L'aménagement forestier, véritable cahier des charges d'une forêt donnée sur une période de 10-20 ans, définit les objectifs à atteindre et les actions à conduire pour différents pas de temps :

- Les choix à long terme définissent les objectifs de la forêt et de ses unités de gestion. On trouve parmi eux le choix des espèces objectifs à privilégier et celui du type de structure de peuplements (régulier, irrégulier). Ces choix affectent la répartition spatiale des espèces et

des individus au sein de la forêt et de ses unités de gestion. Une fois fixés, ils sont difficilement modifiables en profondeur au fil des aménagements.

- Les choix à moyen terme peuvent varier d'un aménagement à l'autre. L'âge d'exploitabilité peut ainsi être modifié lors d'une révision d'aménagement, entraînant alors une modification dans la durée globale du cycle sylvicole et dans les calendriers d'intervention par unité de gestion.

- Les choix à court terme tels que celui concernant la fréquence des prélèvements dans les peuplements ont lieu au cours d'un même aménagement. Cet intervalle de temps entre deux interventions dans une unité de gestion est susceptible d'être modifié d'un aménagement à l'autre. C'est la plus petite échelle de temps fixée par un aménagement. Elle se traduit, dans les peuplements parvenus à maturité sexuelle, par des modifications plus ou moins rapides de la taille de la population reproductrice.

1.4 Une gestion à différentes échelles spatiales

La première échelle spatiale à laquelle intervient la gestion forestière est l'échelle individuelle de l'arbre. En effet, lors des différentes éclaircies conduisant à la mise en régénération, le forestier choisit des arbres sur des critères phénotypiques et selon leur répartition spatiale. Son objectif est ainsi de disposer d'individus de bonne valeur phénotypique, régulièrement répartis dans l'unité de gestion dans le cas de traitement en futaie régulière par exemple.

Le forestier peut également modifier la structure spatiale des peuplements à l'échelle de l'unité de gestion (la parcelle ou la sous-parcelle). Dans une forêt donnée, chaque unité de gestion (et le peuplement qui lui correspond) sera en effet traitée selon la stratégie de régénération (naturelle ou artificielle), le mode de traitement et la sylviculture (mélange, futaie régulière ou irrégulière) définis par le document d'aménagement de la forêt. Les décisions techniques prises dans ce cadre concernent chaque unité de gestion prise séparément, indépendamment des unités de gestion riveraines. Chaque forêt est alors constituée d'une mosaïque d'unités de composition spécifique, de structure et d'âges différents dont les interactions (en particulier les flux de gènes) ne sont pas véritablement prises en compte dans les scénarios de gestion.

Enfin, à plus grande échelle, celle du massif composé d'une ou plusieurs forêts elles mêmes divisées en unités élémentaires, la gestion forestière peut conduire à une fragmentation considérable du paysage en créant des îlots discontinus d'espèces, relativement isolés les uns des autres. L'utilisation de matériel végétal de diverses origines lors de régénérations

artificielles peut aussi modifier considérablement la structure génétique de larges massifs monospécifiques. Ainsi, au lieu d'une seule origine largement répartie sur un massif, on observe couramment des mosaïques d'origines différentes, mettant parfois en contact intime des provenances originellement très éloignées géographiquement. L'origine locale peut alors se trouver diluée et dispersée au sein de peuplements d'autres origines, ce qui constitue une autre forme de fragmentation d'une ressource génétique donnée en massifs forestiers.

2. Dispersion du pollen et qualité génétique de la graine chez les espèces anémophiles

Chez les végétaux, les flux de gènes intègrent deux processus de dispersion : la dispersion du pollen et la dispersion des graines. Suivre la diversité génétique au cours du renouvellement d'un peuplement par régénération naturelle passe par une caractérisation de la qualité des graines à l'origine des nouveaux semis et la connaissance préalable des flux de pollen. Etant donnée l'asymétrie fréquente entre flux de pollen et flux de graines (Streiff et al., 1998a ; mais voir aussi Oddou-Muratorio et al., 2001) et les grandes distances que peut parcourir le pollen (Robledo-Arnuncio et Gil, 2005), la dispersion de celui-ci est considérée comme un déterminant majeur des flux de gènes chez les arbres forestiers (Ennos, 1994). La dispersion du pollen et la fécondation de l'ovule par le gamète mâle sont les premières étapes de la formation de la graine. La qualité génétique des graines définie par le taux d'hétérozygotie et le niveau de consanguinité est donc dépendante des flux de pollen et des facteurs qui les influencent à différentes échelles spatiales : entre arbres d'une même unité de gestion, entre unités de gestion d'une même forêt et plus largement, à l'échelle du paysage, entre forêts.

2.1 Paramètres descriptifs et déterminants des flux de pollen

2.1.1 Paramètres descriptifs

Régime de reproduction

Parmi les paramètres utilisés pour décrire les flux de pollen, certains ne prennent pas en compte la notion de distance entre source et puits et décrivent précisément le régime de reproduction. D'autres, en revanche, utilisent l'information spatiale en prenant en compte la notion de distance pour caractériser la propagation des gènes dans l'espace. Le régime de reproduction des arbres forestiers peut ainsi être caractérisé par :

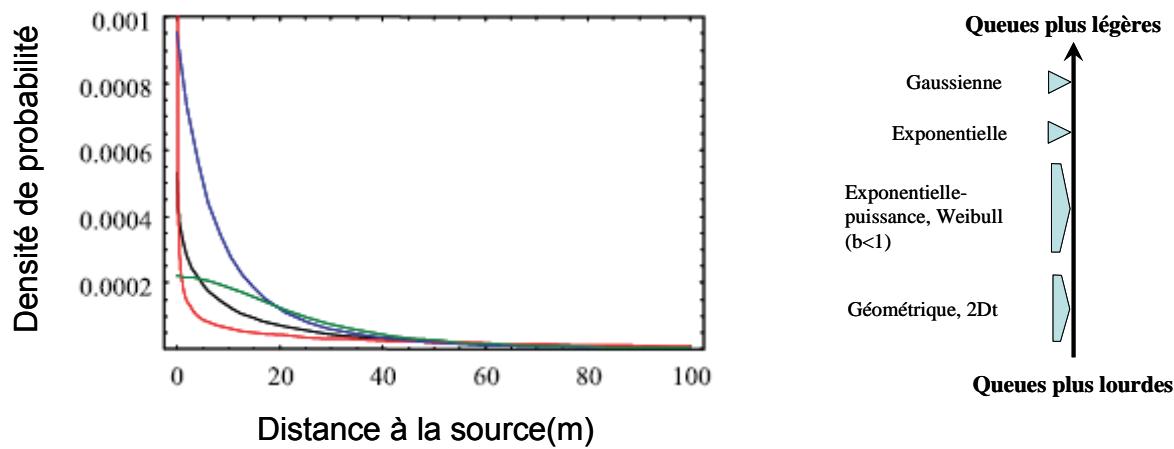


Figure I.7 : Courbes de dispersion souvent utilisées dans les études de dispersion de pollen : fonction Exponentielle puissance (noir), fonction de Weibull (rouge), fonction $2Dt$ (bleu) et fonction géométrique (vert). Le paramètre d'échelle (a) a été fixé pour avoir une distance moyenne de dispersion de 100m.

- le taux d'autofécondation ou d'allofécondation,
- le nombre de génotypes polliniseurs et leur niveau de diversité génétique (on parle de nombre efficace de pères polliniseurs pour s'intéresser aux arbres-pères présentant des génotypes différents, Nep),
- la distance moyenne entre arbre mère et les différents arbres polliniseurs

Courbe de dispersion

Après avoir décrit le régime de reproduction, la seconde étape dans l'étude des flux de pollen consiste souvent à modéliser une courbe de dispersion qui permet d'estimer la probabilité pour un grain de pollen de parcourir une distance donnée. Cette fonction de dispersion, décroissante avec la distance, peut revêtir différentes formes (Austerlitz et al., 2004) (**Figure I.7**). Pour la plupart des espèces forestières étudiées, ce sont des modèles utilisant des fonctions exponentielle puissance (Clark, 1998) qui offrent les meilleurs ajustements aux événements de dispersion observés (Austerlitz et al., 2004 ; Oddou-Muratorio et al., 2005 ; Robledo-Arnuncio et al., 2004a). L'avantage de cette famille de courbes est qu'elle est très flexible et englobe dans ses extrêmes les courbes obtenues à partir de fonctions gaussienne ou exponentielle (Austerlitz et al., 2004). La fonction de dispersion est caractérisée par deux paramètres (Tufto et al., 1997) : un paramètre d'échelle a , qui joue sur la distance moyenne de dispersion et un paramètre de forme b , qui caractérise la queue de distribution (queue légère si $b < 1$ et queue lourde si $b > 1$). On parle de queue lourde de dispersion lorsque, pour des distances élevées, la décroissance de la courbe est moins forte que celle de la courbe exponentielle. Les modèles de dispersion à queues lourdes accordent plus d'importance aux événements de dispersion à longue distance.

2.1.2 Les vergers à graines : des peuplements de référence pour l'étude des déterminants des flux de pollen

Les vergers à graines sont des plantations d'arbres sélectionnés et de génotype connu, établies et conduites autour de trois objectifs : l'optimisation de la production de semences, la stabilité inter annuelle de la composition génétique de cette production et la fourniture de semences génétiquement améliorées sur des critères d'intérêt sylvicole (vigueur, forme, qualité du bois, résistance à un pathogène,...). Certains de ces objectifs, notamment le niveau et l'homogénéité de la production, sont partagés avec les peuplements sélectionnés porte-graines. Par contre, la définition *a priori* de la composition génétique et de la structuration spatiale des vergers à

	Vergers à graines	Peuplements sélectionnés	Peuplements en régénération naturelle
Origine génétique	Connue	Connue	Souvent inconnue
Superficie	Quelques à plusieurs dizaines ha	Plusieurs dizaines ha	Plusieurs dizaines ha
Répartition spatiale	Homogène	Variable	Variable
Structure d'âge	Régulière	Régulière/Irrégulière	Régulière/Irrégulière
Composition	Monospécifique	Mono/pluri spécifique	Mono/pluri spécifique
Isolément	Moyen à fort	Moyen	Variable
Effectif reproducteur	Limité et stable	Elevé	Inconnu et variable
Densité d'individus	Forte	Variable	Variable
Structure génétique	Absence	Possible	Possible
Composition génétique (c)	Diversité forte, apparemment faible	Inconnue, potentiellement élevée	Inconnue
Floraison/Fructification	Connue et gérée	Inconnue, potentiellement élevée	Inconnue
Gestion du niveau de diversité génétique		Gestion du niveau de diversité génétique	Production de graines pour régénération naturelle
Objectifs	Production de graines	Production de graines	Production de bois
	Gain génétique	Production de bois	Production de bois

Tableau I.2: Comparaison des vergers à graines, de peuplements porte-graines sélectionnés et de peuplement de production conduits en régénération naturelle pour différents critères (taille, composition génétique, structure ou voisinage)

graines permet de combiner maintien d'une diversité génétique satisfaisante et obtention de gains génétiques par recombinaison des allèles les plus favorables (**Tableau I.2**). En vergers à graines comme en peuplements de production (du moins dans leur phase de renouvellement), la production de graines est essentielle. Elle doit répondre à un double souci de quantité - permettre de subvenir à un besoin (régénération artificielle ou naturelle) -, mais aussi de qualité génétique suffisante.

Les caractéristiques des vergers à graines en font des modèles simplifiés de peuplement forestier : présence d'une seule espèce, origine génétique connue de chaque individu, répartition spatiale précise et régulière des tiges, absence de structuration génétique, flux de gènes extérieurs nuls ou limités. Leur nombre réduit de génotypes, la possibilité de décrire chaque individu pour de nombreux caractères, la gestion florifère appliquée et la facilité de récolte de semences rendent en outre plus aisée l'étude des flux de gènes et de leurs déterminants. L'analyse, en vergers à graines, des déterminants susceptibles de modifier la qualité génétique des graines produites peut donc constituer une première approche des flux de pollen dans les peuplements forestiers. Toutefois l'extrapolation des résultats obtenus à partir d'études en vergers vers les peuplements forestiers devra être menée avec précaution.

2.1.2.1. Des taux de contamination variables et des causes multiples

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 descendances 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., 2005a), se révèlent souvent très

Espèce	Taille verger (ha)	Nombre de clones (ramets par clone)	Lieu	Outils	Isolement	Taux de contamination (%)	Référence
<i>Abies alba</i>	NA	12 (21)	Danemark	Microsatellites	>1km	1.4 (0-2.7)	Hansen, 2008
<i>Abies sp.</i>	NA	13 (28)	Danemark	Microsatellites	>1km	4.3 (0-7.1)	Hansen et Kjaer, 2001
<i>Cryptomeria japonica</i>	61.4	26 (14.8)	Japon	Microsatellites	<100m	39.2 (23.3-60)	Moriguchi et al ., 2005
<i>Cryptomeria japonica</i>	2.8	54 (11.3)	Japon	Microsatellites	<100m	40.8 (13.3-76.7)	Moriguchi et al ., 2005
<i>Cryptomeria japonica</i>	52	62 (8.5)	Japon	Microsatellites	<100m	47.8 (33.3-73.3)	Moriguchi et al ., 2005
<i>Cryptomeria japonica</i>	27.9	24 (53.3)	Japon	Microsatellites	<100m	50 (13.3-70)	Moriguchi et al ., 2005
<i>Cryptomeria japonica</i>	47.3	35 (4.2)	Japon	Microsatellites	<100m	65.8 (43.3-80.0)	Moriguchi et al ., 2005
<i>Cryptomeria japonica</i>	2.8	54	Japon	Microsatellites	<100m	38.7	Moriguchi et al ., 2007
<i>Larix kaempferi</i>	2.2	10 (38)	Danemark	Microsatellites	>1km	2.8 (0-5)	Hansen, 2008
<i>Larix occidentalis Nutt.</i>	NA	41 (31)	Canada	Microsatellites	<100m	22 (5-36)	Funda et al ., 2008
<i>Picea abies</i>	0.89	118 (5)	Pologne	Isozymes	<100m	83.1 (80.7-95.8)	Burczyk et al ., 2004
<i>Picea abies</i>	13.2	67	Finlande	Isozymes	<100m	70 (51-87)	Nikkanen, 2002
<i>Picea abies</i>	13.2	67 (70)	Finlande	Isozymes	<100m	62.8 (55-68)	Pakkainen et al ., 2000
<i>Picea abies</i>	13.2	67 (47)	Finlande	Isozymes	<100m	76 (70-81)	Pakkainen et al ., 2000
<i>Picea abies</i>	15	50	Suède	Isozymes	200-500m	59	Paule et al ., 1993
<i>Picea abies</i>	11	50	Suède	Isozymes	NA	43	Paule et al ., 1993
<i>Picea glauca</i>	NA	NA	Canada	Isozymes	>1km	0.1-0.6	Schoen et Stewart, 1987
<i>Picea glauca</i>	NA	NA	Canada	Isozymes	>1km	1	Stewart, 1993
<i>Picea mariana</i>	2.8	NA	USA	Pièges a pollen	200-500m	32-83	Caron et Lebalnc, 1992
<i>Picea mariana</i>	NA	NA	USA	Isozymes	200-500m	31.4-62.3	Caron, 1987
<i>Pinus brutia</i>	11.2	28 (60)	Turquie	Isozymes	<100m	85.7	Kaya et al ., 2006
<i>Pinus contorta</i>	4.4	39 (46)	Canada	Microsatellites	200-500m	8 (0-13)	Stoehr et Newton, 2002
<i>Pinus elliottii</i>	2	9	USA	Monoterpènes	<100m	83.5	Squillace et Long, 1981
<i>Pinus pinaster</i>	11.8	NA	France	Microsatellites	<100m	36.5 (19-76)	Plomion et al ., 2001
<i>Pinus pinaster</i>	4	60	France	Microsatellites	200-500m	52.4	Fernandez et al ., 2008
<i>Pinus sylvestris</i>	14	42	Suède	Isozymes	<100m	53.3-57	Lindgren, 1994
<i>Pinus sylvestris</i>	6	30	Suède	Isozymes	<100m	37.8 (10-80)	Nagasaki et Szmidt, 1985
<i>Pinus sylvestris</i>	14	42	Suède	Isozymes	<100m	52 (51-55)	Wang et al ., 1991
<i>Pinus sylvestris</i>	14	42	Suède	Isozymes	<100m	34.2 (28-43)	Yazdani et al ., 1995
<i>Pinus sylvestris</i>	12.5	NA	Finlande	Isozymes	200-500m	36	El Kassaby et al ., 1990
<i>Pinus sylvestris</i>	12.5	NA	Finlande	Isozymes	200-500m	72 (59-78)	Yazdani et Lindgren, 1991
<i>Pinus sylvestris</i>	NA	32	Pologne	Isozymes	>1km	13.3-17.7	Burczyk, 1992
<i>Pinus sylvestris</i>	22.9	NA	Finlande	Isozymes	>1km	47.9	Harju et Nikkanen, 1996
<i>Pinus sylvestris</i>	2	36 (25)	Allemagne	Isozymes	>1km	1.1-2.3	Muller-Starck, 1982
<i>Pinus sylvestris</i>	22.7	NA	Finlande	Isozymes	>1km	44.8-52	Pakkainen et Pulkkinen, 1991
<i>Pinus sylvestris</i>	16	60	Suède	Isozymes	NA	21	El Kassaby et al ., 1990
<i>Pinus sylvestris</i>	3	NA	Finlande	Isozymes	NA	33	Harju et Munoa 1989
<i>Pinus sylvestris</i>	3.2	NA	Finlande	Isozymes	NA	25 (17-39)	Harju et Munoa 1994
<i>Pinus tabulaeformis</i>	20	49	Chine	Isozymes	>1km	46.2 (35.4-58.3)	Shen et al ., 2007
<i>Pinus taeda</i>	2	25 (12)	USA	Isozymes	<100m	36	Friedman et Adams, 1985
<i>Pinus thunbergii</i>	0.5	16	Japon	RAPD	200-500m	2.4	Goto et al ., 2002
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	20	25 (7.5)	USA	Isozymes	<100m	48.9 (42.1-60.6)	Adams et al ., 1997
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	4	NA	Canada	Isozymes	<100m	65 (29-100)	Fast et al ., 1986
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	2.1	59 (6)	USA	Microsatellites	<100m	35 (31-41.3)	Slavov et al ., 2005
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	20	25 (7.5)	USA	Isozymes	<100m	52 (43-64)	Smith et Adams, 1983
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	NA	20 (6)	USA	Microsatellites	<100m	40	Stoehr et al ., 1998
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	4	80	USA	Isozymes	200-500m	5-15	Clare, 1982
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	4	80	USA	Isozymes	200-500m	2 (0-6.6)	El Kassaby et Ritland, 1986
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	4	80	USA	Isozymes	200-500m	15	Fashler et Devitt, 1980
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	NA	NA	NA	Modélisation	NA	30	Sorensen, 1972

Tableau I.3 : Estimation de taux de contamination pollinique en vergers à graines chez plusieurs espèces forestières. Sont présentées la moyenne du verger ou lorsqu'elle est disponible l'étendue de variation pour différents individus du verger. L'isolement correspond à la distance minimale au premier groupe d'individus de la même espèce, qu'il soit de même origine génétique ou non. NA, données non disponibles.

élevés et peuvent varier de 1 à 90% (**Tableau I.3**). 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).

Les études de flux de pollen conduites en vergers à graines permettent de mettre en avant trois facteurs principaux qui peuvent influer sur le taux d'immigration : le degré d'isolement du verger, sa taille et la densité d'individus reproducteurs, les caractéristiques de floraison de ses composants (phénologie et floribondité). Bien qu'une augmentation de l'isolement permette de réduire la contamination, on observe des taux de contamination pouvant s'élever à 45% même pour des vergers isolés de plus d'un kilomètre mais installés dans des zones où l'espèce reste importante (**Figure I.8**). Seul un isolement plus marqué peut sensiblement réduire le taux de contamination. Cette distance, bien que relativement facile à respecter pour la mise en place de vergers, reste toutefois largement supérieure aux dimensions moyennes

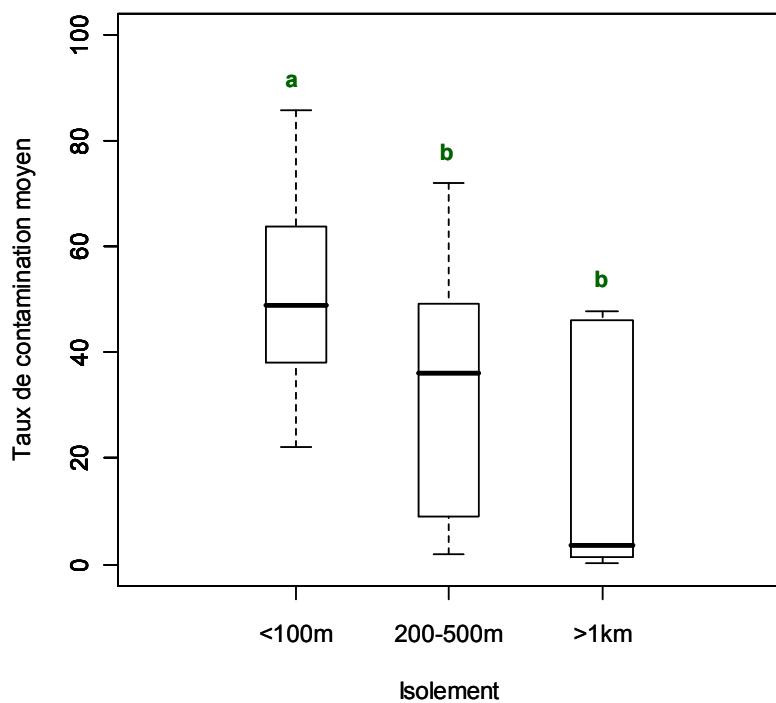


Figure I.8 : Variation du taux de contamination pollinique en vergers à graines en fonction de son degré d'isolement. Graphique réalisé à partir des estimations présentées dans le tableau I.3. Des lettres différentes indiquent une différence significative des taux de contamination au risque de 5%.

des unités de gestion que constituent les parcelles forestières. Il apparaît ainsi difficile de gérer la régénération naturelle d'une parcelle sans prendre en compte la nature des peuplements voisins, leurs flux de pollen et les conséquences de ces derniers sur les caractéristiques génétiques des graines produites dans la zone à régénérer.

Une forte proportion de contamination dans les vergers relativement isolés peut également être due à la faible surface de certains d'entre eux, rendant la part relative du pollen extérieur plus grande et induisant ainsi une plus forte pollinisation par des individus situés hors verger (Mass action hypothesis, Holsinger, 1991b). Ce ratio entre masse de pollen intra verger et masse de pollen extérieur peut également expliquer un taux de contamination élevé dans les vergers récemment mis en place et produisant peu de pollen, comparé à celui de vergers plus âgés (Kaya et al., 2006). En peuplement forestier, la taille de la parcelle jouera donc un rôle important, en plus de son degré d'isolement. Cette double nécessité est d'ailleurs prise en compte dans les réseaux de conservation *in situ* dont les unités conservatoires possèdent une zone centrale de l'ordre d'une dizaine d'hectare, entouré par une zone tampon d'environ 100 hectares : la zone tampon joue donc un double rôle, permettant à la fois d'isoler la zone centrale des peuplements extérieurs en servant de piège à pollen, mais aussi en produisant des grandes quantités de pollen qui diminuent la part relative de pollen extérieur.

Malgré la prise en compte des facteurs de taille, d'âge et d'isolement, il subsiste cependant une part de variabilité difficile à expliquer, qu'on peut en partie attribuer aux variations interannuelles de production de pollen (Kang et al., 2001a) qui peuvent modifier le taux de contamination en verger.

A l'échelle individuelle des arbres intra verger, la forte hétérogénéité du taux de contamination observée peut s'expliquer par la position des individus échantillonnés par rapport à la lisière du verger (Nikkanen et al., 2002 ; Yazdani et Lindgren, 1991) ou par le degré de décalage phénologique entre arbres-mères du verger et les différents polliniseurs présents dans le verger (Harju et Nikkanen, 1996).

2.1.2.2. Une taille efficace réduite par rapport à la taille potentielle de la population reproductrice

De nombreuses études sur la floraison des vergers à graines de conifères ont mis en évidence une forte variabilité individuelle pour la phénologie et l'abondance de floraison (Kjaer 1996, Savolainen et al., 1993 ; Matziris, 1994). Ce phénomène, à l'origine de contributions

gamétiques inégales entre individus (Moriguchi et al., 2007 ; Stoehr et Newton, 2002), a pour conséquences de réduire la taille efficace de la population (Kjaer, 1996 ; Nikkanen et Ruotsalainen, 2000) et de faire varier la composition génétique (apparemment, diversité,...) des graines produites (Kjaer et Wellendorf, 1998 ; Kang et Lindgren, 1998 ; Xie et Knowles, 1994).

On peut estimer la taille efficace de la population en verger à graines à partir de deux méthodes : (i) l'observation des phénologies et les abondances de floraison pour en déduire la taille de la population reproductrice ou (ii) l'analyse des descendances maternelles à l'aide de marqueurs génétiques pour estimer le nombre d'individus qui participent réellement à la reproduction.

Quelle que soit la méthode utilisée, on observe toujours une taille efficace de réduite par rapport au nombre de génotypes reproducteurs mis en place dans le verger. A partir d'observations sur la phénologie et l'abondance de floraison, Gömöry et al (2000) mettent en évidence sur trois vergers à graines de pin sylvestre une taille efficace de population équivalente à 48-72% de l'effectif initial présent dans les vergers. Une étude identique sur *Pinus brutia* (Nikkanen et Ruotsalainen, 2000) aboutit à des estimations similaires : 59 à 84%. Lors d'analyse de descendances maternelles, le patron observé à partir des données de fructification se confirme : la taille efficace de population est considérablement réduite par rapport à la taille potentielle (Stoehr et Newton, 2002). Dans certains cas, la population efficace semble cependant peu réduite et peut compter jusqu'à 92% des individus (Muona et Harju, 1989). En peuplement forestier, on peut donc s'attendre à une diminution de la taille efficace de la population au moins aussi forte que celle observée en vergers à graines.

2.1.2.3. *Un grand nombre de pères différents pollinisant chaque arbre mère*

Malgré cette diminution de la taille efficace de la population le nombre de pères par mère, bien que très variable d'un individu à l'autre (Roberds et al., 1991), apparaît élevé pour l'ensemble des espèces résineuses à pollinisation anémophile étudiées (Stoehr et Newton, 2002 ; Burczyk et al., 1996 ; Roberds et al., 1991). A titre d'exemple, Burczyk (1996) estime que pour 1280 graines de pin sylvestre récoltées sur 32 mères, la taille de la population pollinisatrice avoisine 100 à 150 individus. En analysant le régime de reproduction de deux vergers de *Pinus taeda* et de *Pseudotsuga mensiezii*, Roberts et al (1991) soulignent

l'influence de la phénologie sur le nombre efficace de pères (Nep). Aux arbres à floraison femelle tardive ou précoce sont ainsi associés des Nep plus faibles qu'aux arbres mères dont la réceptivité se situe au pic de production de pollen du verger. Pour le Douglas, les estimations de Nep varient de 2 à 15 pour 15 graines analysées par ramet et pour *Pinus taeda* de 10 à 30 pour 56 graines (Roberds et al., 1991). Bien que ces jeux de données soit trop réduit pour pouvoir prédire précisément le nombre de pères efficaces (intervalle de confiance très grand), cette étude met tout de même en avant la variabilité inter individuelle du nombre de pères efficaces par mère mais aussi sa valeur élevée chez ces deux conifères.

En vergers à graines, les individus sont le plus souvent installés à grand écartement de façon à favoriser les floraisons mâles et femelles. Ils bénéficient le cas échéant de protocoles de stimulations florales visant à réduire les écarts de floraison entre individus et sont organisés spatialement de manière à favoriser la panmixie et la contribution d'un maximum de pères. Les peuplements naturels, à l'inverse, ne bénéficient pas de ces conditions : on peut donc s'attendre à ce que la taille efficace et le nombre de pères par mère y soient encore plus réduits qu'en verger à graines.

2.1.2.4. De faibles taux d'autofécondation

Les taux d'autofécondation observés en vergers à graines sont généralement faibles et relativement similaires d'un individu à l'autre, avec des estimations variant entre 1 % et 8 % chez le pin sylvestre (Muller-Starck, 1982 ; Muona et Harju, 1989 ; Gömöry et al., 2000). Les valeurs observées sont comparables pour les autres espèces de conifères et très généralement inférieures à 10% sauf exception (Hansen et Kjaer, 2006 pour *Abies* : 32%). Il convient cependant de remarquer que les taux d'autofécondation estimés à partir d'analyses sur les seules graines viables (*i.e* graines pleines) sont généralement sous-estimés : en effet, la dépression de consanguinité est chez plusieurs espèces de pins à l'origine d'avortements embryonnaires précoce qui diminuent drastiquement le taux de développement des graines autofécondées (Gömöry et al., 2000).

Les estimations des taux d'autofécondation en peuplements de production se rapprochent des valeurs observées en vergers avec des valeurs de 1 à 6% pour le pin sylvestre (Robledo-Arnuncio et al., 2004a). Il est à noter que des taux moyens de 25% ont été observés dans des peuplements de petite taille et très isolés de cette même espèce (Robledo-Arnuncio et al., 2004b). Comparés aux vergers, les peuplements de production semblent présenter une plus

forte variabilité de taux d'autofécondation entre individus (0-75% pour Robledo-Arnuncio et Gil, 2005). Cette variabilité plus forte peut être expliquée notamment par une répartition spatiale irrégulière des arbres en peuplement naturel : certains sont situés dans des zones peu denses en reproducteurs, situations plus favorables à l'autofécondation lorsque la quantité de pollen devient limitante (Robledo-Arnuncio et al., 2004b). Les fortes hétérogénéités de structure et de répartition spatiale des individus généralement observées dans les peuplements forestiers constituent une différence majeure avec les vergers à graines où les reproducteurs sont régulièrement répartis et cette différence devra être prise en compte dans l'analyse des flux de pollen en peuplements forestiers.

2.1.2.5. Une forte variabilité des contributions polliniques des reproducteurs, des causes multiples

En analysant des descendances maternelles à l'aide de marqueurs génétiques, il est courant d'observer que tous les individus d'un verger à graines ne participent pas à la création du pool de graines et que les contributions individuelles mâles dans les descendances varient d'un individu à l'autre. D'une manière générale, quelques individus contribuent pour une part relativement élevée alors qu'un très grand nombre d'individus contribuent très peu (El-Kassaby, 1995; Burczyk et al., 1997; Gömöry et al., 2000). D'après différentes études, seulement 20 à 40% des individus produisent 60 à 75% des gamètes mâles à l'origine des graines récoltées (Yazdani et al., 1995 ; Hansen et Kjaer, 2006 ; O'Reily et al., 1982 ; Schoen et Stewart, 1987). A titre d'exemple, la contribution gamétique mâle individuelle (ou fécondité mâle) peut ainsi varier de 0,3% à 9,4% des graines produites (Stoehr et Newton, 2002) et peut même parfois atteindre 34% (Stewart, 1994). Une telle variabilité individuelle des succès reproducteurs mâles peut avoir différentes causes.

Le synchronisme de floraison

La phénologie de floraison est probablement le déterminant qui influence le plus le succès reproducteur mâle des individus (Wheeler et al., 1992 ; Ericksson et Adams, 1989 ; Burczyk et Prat, 1997). Un décalage phénologique de floraison trop important peut empêcher le croisement entre certains individus ; de plus le succès reproducteur des individus dont la période d'émission du pollen est décalée par rapport à la période de réceptivité de la majorité des fleurs femelles peut être considérablement diminué. Les croisements entre individus synchrones sont donc favorisés (Slavov et al., 2005a ; Erickson et Adams, 1989 ; Goto et al.,

2002), et le succès reproducteur d'un individu père pour un arbre mère donné est d'autant plus élevé que la durée de synchronisme des floraisons est longue (Burczyk et Prat, 1997).

En peuplement naturel et à l'échelle d'une unité de gestion de plusieurs hectares, on peut également s'attendre à des décalages de phénologie de floraison d'ampleur au moins égale à celle observée en vergers. Les données disponibles sont très rares mais quelques travaux disponibles (consacrés aux possibilités d'hybridation entre taxons) mettent effectivement en évidence une variabilité des phénologies de floraison, mâle et femelle (Boratynsky et al., 2003 ; Bouchet, 2007) chez le pin sylvestre notamment.

La distance entre source et puits de pollen

Outre la phénologie de floraison, la distance entre individu source et puit de pollen joue un rôle prépondérant (Moriguchi et al., 2007, Erickson et Adams, 1989). Ainsi, bien que des événements de dispersion à longue distance existent, la majorité du pollen est dispersé à courte distance : Les distances moyennes de dispersion du pollen sont de 50m pour *Picea glauca* (Schoen et Stewart, 1987) ; 30m pour *Pinus tabulaeformis* (Shen et al., 2007). La probabilité de croisement diminue avec la distance entre source et puits (Burczyk et Prat, 1997 ; Shen et al., 1981 ; Yazdani et al., 1989). Il apparaît ainsi que des croisements privilégiés ont lieu entre arbres voisins : pour un même arbre mère, les individus mâles les plus proches auront des contributions polliniques plus fortes que des individus plus éloignés. Toutefois, l'effet distance peut apparaître non significatif lorsque le synchronisme de floraison n'est pas pris en compte (Erickson et Adams, 1989), alors que dans les cas de forte synchronie, il peut expliquer plus de 38% de la variabilité du succès reproducteur (Erickson et Adams, 1989).

Contrairement aux vergers à graines, les peuplements forestiers ne bénéficient pas d'une répartition spatiale rigoureusement homogène des arbres reproducteurs. Les caractéristiques de voisinage (densité locale de pères potentiels) peuvent donc varier sensiblement d'un arbre mère à l'autre et ces variations locales dans la structure spatiale du peuplement vont renforcer les effets distance observés en verger.

La fertilité mâle des individus

La fertilité mâle des individus, i.e leur capacité à engendrer des descendants, est proportionnelle à la quantité de pollen qu'ils produisent. Toutes choses étant égales par ailleurs (distance et phénologie), les individus dont la floraison mâle est la plus abondante ont un succès reproducteur plus élevé (Moriguchi et al., 2007 ; Burczyk et Prat, 1997 ; Stoehr et

Newton, 2002 ; Schoen et Stewart, 1987). La prise en compte de la fertilité et de la phénologie permet d'expliquer une part importante de l'hétérogénéité des contributions observées (18% pour Moriguchi, 2007 ; 75% pour Schoen et Stewart, 1987). Cependant, l'effet de la fertilité mâle peut apparaître significatif seulement pour des individus à phénologie intermédiaire ou tardive ; on peut alors supposer qu'en début de période de floraison, alors que peu de pollen est produit, le recouvrement des périodes de floraison constitue le facteur déterminant du succès reproducteur mâle (Burczyk et Prat, 1997).

En peuplements forestiers, on peut émettre l'hypothèse d'une variabilité de fertilité individuelle au moins égale à celle observée en vergers à graines, cette caractéristique n'étant pas (fertilité mâle) ou peu (fertilité femelle) prise en compte par les gestionnaires comme critère de sélection des arbres tout au long du cycle sylvicole. Les conséquences de cette variabilité devraient donc être au minimum égales à celles mesurées en vergers à graines.

L'anisotropie de dispersion du pollen

L'anisotropie des patrons de dispersion du pollen a été relativement peu étudiée. La principale difficulté vient du fait que la direction des vents peut varier fortement durant la période de pollinisation qui est relativement courte, alors que la plupart des approches ne sont capables de détecter l'anisotropie que si la dispersion se fait dans une seule direction privilégiée (Burczyk et Prat, 1997). A partir d'une approche par capture des allèles rares, Shen et al (1981) ont montré que la dispersion avait lieu préférentiellement dans la direction des vents dominants. Burczyk et Prat (1997) ont montré en revanche que, bien qu'il n'existe pas de direction privilégiée pour l'ensemble des individus étudiés dans un verger, le regroupement des individus mâles en classes de phénologie permet de mettre en avant une anisotropie significative dont la direction varie selon celle des vents en début de période de floraison de chaque classe. Ainsi, en cas d'anisotropie et tous autres facteurs égaux par ailleurs (distance, phénologie et fécondité), les pères situés dans une certaine direction par rapport à l'arbre mère ciblé auront un succès reproducteur plus élevé.

La disposition spatiale irrégulière des tiges peut constituer une source supplémentaire (par rapport aux vergers) d'anisotropie par les modifications possibles de la circulation des flux d'air au-dessus et à l'intérieur des peuplements naturels.

2.1.2.6. De fortes variations inter annuelles de fertilités mâle et femelle

De larges variations interannuelles de fertilités mâles et femelles des individus ont couramment été observées (Bila, 2000 ; Kang et al., 2001a ; Schoen et al., 1986). Ces variations peuvent être dues aux conditions climatiques plus ou moins favorables au moment de l'initiation florale, l'année précédent la floraison mais aussi aux conditions climatiques l'année de floraison (gelées tardives, pluies limitant la dispersion de pollen). En verger, les variations de fertilité mâle, dues notamment aux conditions climatiques (Krouch et al., 2004), semblent cependant supérieures à celles de la fertilité femelle (Bila, 2000 ; mais voir Schoen, 1985). Il en résulte des variations inter annuelles du taux de contamination (Shen et al., 2007 ; Fast et al., 1986), mais aussi des variations dans le régime de reproduction (Shen et al., 2007), dans le succès reproducteur mâle et dans la taille efficace de la population (Schoen et Stewart, 1987). Les années où le pollen est peu abondant, ces variations peuvent aussi engendrer une augmentation du coefficient d'apparentement des graines produites (Kang, 2001).

2.2 Comment extrapolier les connaissances acquises en verger à graines aux peuplements forestiers de production ?

L'analyse des travaux menés en vergers à graines a permis de mettre en avant les principaux déterminants des flux de pollen qu'on peut regrouper en trois classes :

- les déterminants **totalement dépendants** de la gestion du peuplement reproducteur: distance entre arbres, présence d'écrans physiques entre individus, nombre de reproducteurs ;
- les déterminants **partiellement contrôlables** par la gestion de ce peuplement : floraison, fructification, dimension des tiges et de leurs houppiers ;
- les déterminants **indépendants** de la gestion de ce peuplement: climat, topographie, voisinage du peuplement pouvant participer à la pollinisation, phénologie de floraison et sa variabilité, compétition pollinique.

A partir du modèle simplifié de peuplement forestier que représente un verger à graines, il apparaît important de réévaluer l'importance de ces différents déterminants en situation de peuplement forestier faisant l'objet d'une gestion préparatoire à la régénération naturelle. Ces

Espèce	Taille de voisinage prise en compte	Nombre individus dans voisinage	Taux immigration (%)	Type de peuplement	Référence
<i>Araucaria angustifolia</i>	14 ha	56	54	Massif	Bittencourt & Sebenn, 2007
<i>Fraxinus sp.</i>	300 ha	88	45-65	Paysage fragmenté	Bacles et al., 2005
<i>Pinus attenuata</i>	0,04 ha	79	55-61	Petit peuplement isolé	Burcky et al., 1996
<i>Pinus densiflora</i>	9,12 ha	NA	31	Massif	Lian et al., 2001
<i>Pinus flexilis</i>	11 ha	290	6,5	Petit peuplement isolé	Schutter & Mitton, 2000
<i>Pinus pinaster</i>	0,78 ha	396	85	Massif	Robledo et al., 2005
<i>Pinus sylvestris</i>	30 km	36	4,3	Petit peuplement isolé	Gonzales-Martinez et al., 2006
<i>Quercus macrocarpa</i>	5 ha	62	55	Paysage fragmenté	Dow & Ashley, 1998
<i>Quercus sp.</i>	5,76 ha	296	67	Massif	Streiff et al., 1999

Tableau I.4 : Estimation de taux d'immigration du pollen en peuplements forestiers pour différentes espèces anémophiles. Les différences de tailles de voisinage mais aussi de types de peuplements rendent difficile la comparaison entre études.

déterminants affecteront à la fois la diversité génétique du peuplement reproducteurs et les flux de gènes intra et inter-parcelles au moment de la mise en place de la régénération.

2.2.1 Immigration, pool génétique et performances adaptatives

En verger à graines, les espérances de gains génétiques et le contrôle du niveau de diversité sont estimées en supposant un fonctionnement panmictique du verger (événements de recombinaison équiprobables entre tous les individus du verger). L'écart entre gain génétique (resp. diversité génétique) attendu et gain génétique (resp. diversité génétique) observé dépendra de la variabilité des contributions parentales mais aussi du taux de contamination par du pollen extérieur (Stoehr et al., 1998). De même en peuplement forestier, la qualité génétique des graines assurant la régénération naturelle dépendra des taux d'immigration et de l'hétérogénéité des contributions parentales.

Dans les peuplements forestiers, le taux d'immigration de pollen se définit pour un arbre-mère donné comme le pourcentage de graines pollinisées par des arbres situés en dehors d'un voisinage défini comme centré sur cet arbre et souvent inclus dans les limites de l'unité de gestion. Bien que difficilement comparables les uns aux autres en raison des différences de taille de voisinage étudiée et de type de peuplement, les taux d'immigration observés en peuplements forestiers sont d'ordre de grandeur similaire à ceux mesurés en vergers à graines (**Tableau I.4**) et permettent de supposer l'existence de flux de pollen non négligeables à longue distance. Si les peuplements isolés sont moins sujets à ces flux hors parcelles que les peuplements situés dans de larges massifs, ces taux restent significativement différents de zéro même lorsque la distance d'isolement dépasse 30km (Robledo-Arnuncio et Gil, 2005). Les conséquences génétiques de ces flux de pollen entre unités de gestion dépendent non seulement de l'ampleur du phénomène mais aussi du degré de différenciation génétique entre les populations concernées (El Kassaby et al., 1989 ; Hartl et Clark, 1989). De fortes différences dans la composition génétique des unités de gestion impliquées dans ces échanges peuvent profondément affecter le pool génétique des graines produites, et ce même si le taux d'immigration est faible (Lindgren et Mullin, 1998). Dans les massifs forestiers, le transfert de matériel forestier de reproduction (graines ou plants) consécutif à des opérations de plantations se traduit souvent par un rapprochement géographique entre espèces ou provenances jusqu'alors isolées les unes des autres. Etant donnée l'ampleur des flux de gènes observés en vergers, on peut supposer que de telles situations vont se traduire par des

échanges génétiques entre populations génétiquement différenciées. Le temps nécessaire pour mesurer les conséquences de tels flux de pollen sur les capacités d'adaptation des populations locales qu'elles soient autochtones ou non est long et la méthodologie d'évaluation difficile à mettre en oeuvre. Cependant, Aho (1994) a déjà mis en évidence l'influence de l'origine du pollen sur la tolérance au froid chez des jeunes semis issus de descendance maternelles de pin sylvestre : les semis issus de pollinisation par des pères provenant de populations situées au Sud sont plus sensibles au froid que ceux issus de pères provenant de populations nordiques.

Lors de la mise en régénération d'un peuplement, le gestionnaire forestier ne peut donc pas considérer ce dernier comme une population isolée mais comme un groupe d'arbres qui interagit avec son voisinage y compris via des flux de pollen. Toutes les actions visant à assurer une production optimale de graines pour la régénération naturelle doivent alors tenir compte de la présence et de la nature de boisements interfertiles à l'échelle du massif et du paysage. Cette prise en compte est encore plus cruciale dans le cas particulier de la gestion de ressources génétiques originales et intéressantes à conserver, pour lesquels les phénomènes d'immigration jouent un rôle essentiel dans la définition de stratégies de conservation.

2.2.2 Conséquences du choix des reproducteurs sur la taille efficace de la population à renouveler

La capacité à se reproduire, c'est à dire à produire du pollen et des graines, est un des facteurs les plus importants dans l'évolution et la gestion génétique des populations. Dans un peuplement adulte parvenu à maturité sexuelle et pour une année donnée, seule une partie des individus participe activement à la reproduction (El-Kassaby, 1995). Tous les individus ne fleurissant pas chaque année, on observe une forte variabilité inter annuelle dans la composition et la taille de la population reproductrice (Dodd et Silvertown, 2000 ; Finkeldey et Ziehe, 2004). Cette variabilité induit des variations quantitatives et qualitatives des graines produites (Konnert et Behm, 1999 ; Stoehr et al., 2005) et peut se traduire par une perte de diversité génétique chez les semences par rapport à la population reproductrice (Bila, 2000). Malgré ces variations interannuelles, un grand nombre de pères participent chaque année à la reproduction (83-125 dans l'étude réalisée sur *Pinus sylvestris* par Robledo-Arnuncio et al., 2004b ; voir aussi revues de Smouse et Sork, 2004 et Hardy et al., 2004). Ce nombre efficace

de pères (Nep) augmente quand la densité du peuplement diminue (El-Kassaby et Jaquish, 1996), probablement en raison d'un meilleur brassage du pollen en milieu ouvert.

La plupart des traits de reproduction sont connus pour être sous fort contrôle génétique (Byram et al., 1986 ; Fries, 1994), et l'existence de génotypes bon producteurs de pollen et de graines a déjà été mise en évidence dans de nombreux vergers (Burczyk et Chalupka, 1997 ; Kang and Lindgren, 1998) et peuplements naturels (Linhart et al., 1979). Chez plusieurs espèces monoïques étudiée, il semble également fréquent d'observer une assymétrie de floribondité mâle et femelle (Burczyk et Prat, 1997 ; Muona et Harju, 1989). Bien que des variations environnementales (difficilement contrôlables) puissent également modifier l'aptitude à la floraison (Krouchi et al., 2004), la capacité individuelle à se reproduire mériterait d'être évaluée et prise en compte, dans les programmes de conservation de ressources génétiques (Varghese et al., 2000, Meffe et Carroll, 1997) mais aussi dans le cadre de la gestion ordinaire lors de la sélection des arbres destinés à renouveler un peuplement. A défaut, la quantité et la diversité des graines produites risquent d'être négativement affectées par la sélection involontaire de reproducteurs à faible capacité de production de pollen et de graines qui se traduirait par une réduction induite de la taille efficace de la population en cours de régénération. Il conviendrait de moduler le choix d'une densité finale de reproducteurs pour tenir compte de conditions pédoclimatiques plus ou moins favorables à la production de pollen.

2.2.3 Sylviculture à l'échelle de l'unité de gestion et régime de reproduction

Plusieurs auteurs de synthèses récentes regrettent explicitement le peu de données disponibles sur les relations entre diversité génétique des principales espèces forestières et modes de conduite des peuplements actuels (Ledig, 1992 ; Savolainen et Karkkainen, 1992 ; Rotach, 1994 ; Finkeldey et Ziehe, 2004 ; Marquardt et al., 2007). L'influence de la sylviculture et notamment celle du type d'éclaircies sur le régime de reproduction s'appuie généralement sur la comparaison entre la diversité génétique des adultes du peuplement et celle de la régénération dans un peuplement de taille réduite appartenant le plus souvent à un massif forestier plus vaste (Robledo-Arnuncio et al., 2004a). Les travaux réalisés ont conclu dans leur majorité à l'absence d'effet de la densité ou du type d'éclaircies sur le système de reproduction des espèces forestières anémophiles (Neale et Adams, 1985 ; Morgante et al., 1991 ; Stoehr, 2000 ; Perry et Bousquet, 2001). Il apparaît ainsi qu'en situation de larges massifs forestiers les flux de pollen entre parcelles sont assez forts pour masquer l'influence,

sur le régime de reproduction, de la sylviculture appliquée localement à une unité de gestion. Bien qu'apparemment sans influence sur les caractéristiques génétiques globales d'une population d'arbres forestiers considérée dans son ensemble à l'échelle d'un massif étendu, rien n'indique pourtant qu'à une échelle plus faible, les flux de pollen ne soient pas affectés par les choix sylvicoles.

2.2.4 Structure du peuplement, autofécondation et consanguinité.

A l'échelle du peuplement, une corrélation négative entre densité d'arbres reproducteurs et taux d'autofécondation a pu être mise en évidence pour certaines espèces (*Pinus ponderosa* : Farris et Mitton, 1984 ; *Larix laricina* : Knowles et al., 1987 ; *Pinus sylvestris* : Robledo-Arnuncio et al., 2004b), mais pas pour d'autres (*Pseudotsuga menziesii* : Neale et Adams, 1985 ; *Pinus jeffreyi* : Furnier et Adams, 1986, *Picea abies* : Morgante et al., 1991). Dans certains cas, ces différences peuvent être, en partie au moins, expliquées par l'écologie de la reproduction des espèces (El-Kassaby et Davidson, 1991), la structure des peuplements (El-Kassaby et Jaquish, 1996), ou par des seuils de densité variables entre espèces (Pichot et al 2006). Toutefois, aucune étude ne caractérise précisément l'environnement du peuplement étudié (peuplement isolé, partie d'un vaste massif). Pourtant, étant donnée la forte proportion de graines autofécondées mesurée dans un peuplement isolé de pin sylvestre (25% en moyenne pour Robledo-Arnuncio et Gil, 2005), on ne peut écarter l'hypothèse de l'influence des caractéristiques du voisinage sur le taux d'autofécondation à l'intérieur d'un peuplement. A l'échelle individuelle, Robledo-Arnuncio et Gil (2005) mettent en évidence, dans un peuplement isolé, que le taux d'autofécondation pour un arbre donné est d'autant plus fort que la densité locale de ses voisins dans un rayon de 10m est faible. Cette relation s'explique par le fait que le succès de pollinisation d'un père est fonction de sa contribution relative à la quantité de pollen enveloppant le houppier d'un arbre-mère donné (Mass action hypothesis, Holsinger, 1991b). Dans des populations isolées, la quantité de pollen n'est probablement pas saturante et un individu entouré de très peu de voisins contribue fortement au nuage pollinique qui l'entoure, engendrant ainsi un taux d'autofécondation élevé. Cette relation n'a jamais été décrite dans des situations de vastes massifs, probablement en raison des fortes quantités de pollen produites.

Sur le plan quantitatif, une faible densité de reproducteurs peut provoquer une diminution significative de la quantité de graines viables produites, chez le sapin (Pichot et al., 2006) ou

chez le pin sylvestre (Robledo-Arnuncio et al., 2004b), probablement en raison du fort taux d'avortement des graines autofécondées (Sarvas, 1962 pour le pin sylvestre).

Sur le plan qualitatif, les semis issus d'autofécondation ou de croisements entre individus consanguins ayant généralement une fitness plus faible que ceux issus d'allofécondation (**Figure I.2**), l'importance de la structure spatiale du peuplement peut donc affecter négativement la qualité génétique des graines produites. De forts taux d'autofécondation répétés dans le temps peuvent en outre conduire à une réduction de la taille efficace de la population, ce qui engendrera en retour une forte consanguinité des individus et une diminution de la diversité par dérive génétique (Loveless et Hamrick, 1984).

De même, il conviendrait d'évaluer si une répartition spatiale régulière ou en bouquets des reproducteurs au sein de la parcelle peut avoir un impact sur la diversité génétique de la régénération obtenue. Plusieurs études ayant montré qu'aussi bien en vergers à graines qu'en peuplements forestiers, la plus grande partie du pollen est dispersée sur de courtes distances (Bittencourt et Sebbenn, 2007 ; Robledo-Arnuncio et Gil, 2005 ; Sork et al., 2002 ; Smouse et al., 2001), les croisements entre individus proches sont favorisés. Les nuages polliniques captés par les arbres-mères d'une même unité de gestion sont différenciés génétiquement (Smouse et al., 2001 ; Robledo-Arnuncio et al., 2004a ; Fernandez-Manjarrés et al., 2006 ; Nakanishi et al., 2005 ; Dyer et Sork, 2001). Etant donné l'existence d'une structuration spatiale locale de la diversité génétique chez les adultes dans de nombreux peuplements d'espèces anémophiles (Mardquart et Epperson, 2004 ; Streiff et al., 1999 ; Berg et Hamrick, 1995), une dispersion de pollen limitée dans l'espace peut privilégier le croisement entre individus apparentés et entraîner un déficit en hétérozygotes dans la population de graines produites (Bittencourt et Sebbenn, 2007). Les fortes contributions polliniques de quelques pères dans une descendance donnée donnant naissance à des individus pleins frères est évalué à l'aide du paramètre r_p , « correlated paternity » défini comme le pourcentage d'individus pollinisés par un même père dans une descendance donnée (Ritland, 1989 ; Schoen et Clegg, 1984). Ce phénomène semble être relativement fréquent dans les populations isolées ($r_p = 19.6\%$, Robledo-Arnuncio et al., 2004b), alors que dans de larges massifs, il apparaît nettement plus rare : $r_p = 0,048\%$ chez *Pinus pinaster* (De Lucas et al., 2008), $r_p = 0\% - 0,5\%$ chez *Pinus sylvestris* (Robledo-Arnuncio et al., 2004b), bien que de fortes densités d'individus semblent le favoriser (El-Kassaby et Jaquish, 1996 ; Sousa et al., 2005). A l'échelle individuelle, il existe une corrélation positive entre « correlated paternity » et densité locale d'individus, ce qui peut être interprété par le fait que des individus isolés captent des

nuages plus diversifiés que des individus situés en zone plus dense, probablement sous forme de cumul de queues de dispersion de pollen provenant de nombreux individus (Robledo-Arnuncio et al., 2004b). Les principales conséquences génétiques de ce phénomène sont d'une part la présence d'un apparentement moyen plus élevé dans les descendances produites que dans le peuplement adulte reproducteur (Muona et al., 1991 ; El-Kassaby et Jaquish, 1996 ; Bittencourt et Sebbenn, 2007), et ce notamment pour les années de faibles floraisons (Kang et al., 2003). D'autre part la “correlated paternity” est généralement plus élevée entre graines d'un même arbre-mère qu'entre graines de différents arbres (Sampsom, 1998).

Au-delà, d'une réflexion sur la conduite de la régénération naturelle, ces résultats ont des implications importantes pour les stratégies de récolte en peuplements porte-graines et pour la conservation des ressources génétiques. Ainsi, la dispersion limitée du pollen dans l'espace et la différenciation des nuages polliniques démontrent la nécessité de récolter les semences d'arbres répartis dans l'ensemble du peuplement et à des distances supérieures à 100 m les uns des autres afin de capter le plus de diversité génétique possible. De plus, le choix de distances minimales entre semenciers récoltés permet de réduire le risque de récolte de graines apparentées du côté maternel en cas de structure spatiale de la diversité génétique à petite échelle.

2.2.5 Variabilité du succès reproducteur mâle en peuplements forestiers

Tout comme en vergers à graines, les études en peuplements forestiers montrent de fortes variations de contributions paternelles parmi les individus qui se reproduisent. Un petit nombre d'individus contribue à une forte proportion des descendances maternelles, alors que de nombreux individus n'y participent que de manière mineure (Dow et Ashley, 1998, Sork et al., 2002). Les facteurs permettant d'expliquer la variabilité du succès reproducteur mâle dans les vergers à graines ont aussi été détectés en peuplements : taille de l'individu et intensité de floraison mâle (Goto et al., 2006), anisotropie de dispersion du pollen (Robledo-Arnuncio et Gil, 2005) et différence de phénologie de floraison (Gérard et al., 2006).

D'une manière générale, la variabilité de fertilité mâle est supposée plus forte en peuplements forestiers qu'en vergers à graines en raison de l'hétérogénéité des âges, des densités locales de tiges (Krouchi et al., 2004) et de l'absence de techniques d'induction florale visant à favoriser l'homogénéité de la floraison. Les caractéristiques génétiques des graines produites peuvent ainsi varier d'une année à l'autre (Burczyk et Prat, 1997, Nakanishi et al., 2005), même si

ette variabilité temporelle est considérée comme inférieure à celle existant entre différentes parties d'un même peuplement pour une année donnée (Wang, 2003 ; Gregorius et al., 1986). Pourtant les comparaisons inter-annuelles des flux de pollen restent relativement rares en peuplements forestiers et ce en dépit l'intérêt qu'elles pourraient apporter pour :

- Evaluer les différences de composition génétique entre lots de semences récoltés au cours de différentes années dans un même peuplement porte-graines ;
- Evaluer le niveau de différentiation et de diversité génétique des contributions annuelles successives d'un peuplement semencier à une régénération naturelle qui s'étalerait sur plusieurs années.

2.3 Bilan sur les flux de pollen

Les premiers travaux visant à comprendre l'influence de perturbations (sylvicoles ou non) sur le régime de reproduction consistaient à comparer la diversité génétique d'un peuplement adulte et celle de sa régénération naturelle. Plus récemment, de nouvelles méthodes utilisant des marqueurs moléculaires (Smouse et al., 2001 ; Burczyk et Prat, 1997) permettent de préciser les flux pollen à l'échelle d'un peuplement forestier et d'en caractériser les déterminants essentiels. Il s'avère donc possible de mesurer l'influence de la structuration spatiale du peuplement adulte sur le régime de reproduction et d'utiliser ces connaissances pour mieux comprendre l'influence des actions sylvicoles sur le régime de reproduction et sur les flux de gènes. L'analyse bibliographique réalisée met en évidence l'importance probable du voisinage reproducteur à grande échelle dans la diversité génétique des graines produites par un peuplement donné compte tenu des fortes capacités de dispersion du pollen. Elle souligne également l'importance de la structure spatiale locale (densité notamment) du peuplement reproducteur et des caractéristiques individuelles des arbres de ce peuplement dans les flux de pollen en peuplement forestier.

Le gestionnaire, dont les interventions modifient l'ensemble ou partie de ces déterminants, doit avoir conscience de l'importance de ses décisions pour l'avenir du peuplement en terme de diversité génétique. Il convient donc d'aider les gestionnaires forestiers à décider de la stratégie à mettre en place quant à la conservation du « pool génétique » à l'échelle d'une unité de gestion mais aussi d'une ressource plus large à l'échelle du massif.

Le travail effectué par le généticien à partir de données moléculaires permet de définir la taille effective de la population et doit être pris en compte par le gestionnaire afin de ne plus mener des actions en se basant uniquement à l'échelle de la parcelle mais plutôt à une échelle considérée comme l'unité de reproduction. Il convient donc de définir l'échelle la plus pertinente à prendre en compte lors des stratégies de régénération naturelle, permettant à la fois une prise en compte des flux de pollen à longue distance mais aussi les caractéristiques du peuplement à régénérer. Le problème de transfert de connaissances ou de compréhension entre généticiens et forestiers est que le premier a une approche populationnelle ou individuelle, alors que le gestionnaire a une approche centrée sur la parcelle, véritable unité de gestion. La principale difficulté réside donc en le passage d'une échelle à l'autre, puisqu'il faudrait définir dans quelles situations l'unité de reproduction se rapproche plutôt de la parcelle, du groupe de parcelles proches ou de l'ensemble du massif forestier.

3. Dispersion des graines chez les espèces anémochores

Après la dispersion du pollen, la dispersion des graines constitue une étape supplémentaire des flux de gènes dans les peuplements forestiers. Alors que les mesures de flux de pollen sur lots de graines ne sont encore que des estimations de flux de gènes potentiels, l'analyse de la dispersion des graines permet de se rapprocher des flux de gènes efficaces. La phase de dispersion des graines est à la base de la régénération naturelle des peuplements forestiers et elle conditionne la répartition des semis dans l'espace. Par contre, la qualité génétique (diversité, hétérozygotie) des jeunes semis issus de ces graines, est non seulement conditionnée par leur origine maternelle mais aussi par flux de pollen réalisés. Il s'agit d'un des rares processus biologiques qu'observe (et parfois mesure) le gestionnaire forestier, avec les fructifications (régulièrement en peuplements porte graines pour prédire des récoltes, plus ponctuellement lors de la mise en régénération d'un peuplement).

Cependant, les études sur la dispersion des graines à l'échelle d'un peuplement forestier demeurent relativement rares. Ces travaux portent le plus souvent sur une seule population et pour une année donnée (Clark et al., 1999a), en privilégiant les évènements à courte distance et sans prendre en compte les effets micro-stationnels (Nathan et Muller-Landau, 2000). Ces références bibliographiques, nettement moins riches sur ce sujet que sur la dispersion du pollen, permet tout de même de préciser des descripteurs et déterminants des flux de graines en peuplements forestiers.

3.1 Paramètres descriptifs des flux de graines

Les paramètres descriptifs de la dispersion des graines sont relativement similaires à ceux du pollen :

- courbe de dispersion permettant de quantifier le nombre de graines en un point de l'espace,
- nombre et diversité des arbres-mères contribuant aux apports de graines en un point donné de l'espace,
- distinction des apports en graines en provenance de l'intérieur ou de l'extérieur d'un espace de référence (unité d'étude ou unité de gestion par exemple),
- niveau et structuration spatiale diversité génétique des graines dispersées.

Pour une graine récoltée sur un arbre mère connu, la contribution génétique de chacun des parents (père ou mère) attribuable après génotypage peut être connue par déduction. En revanche, sur une graine piégée au sol ou sur un semis naturel, il s'avère difficile de déterminer la part de patrimoine héréditaire attribuable à chaque parent. Les marqueurs à hérédité maternelle chez les Gymnospermes sont les marqueurs mitochondriaux. Ils ne sont malheureusement pas assez variables pour obtenir une puissance suffisante en analyses de parenté. De plus, les approches par piégeages de graines se heurtent souvent à des problèmes méthodologiques. Alors qu'il est aisé de définir un seuil minimum d'individus à récolter (les descendances maternelles) dans les études de flux de pollen, il s'avère impossible de maîtriser ce seuil lors de piégeages, la dispersion n'étant pas connue par avance. En raison de l'effectif limité généralement piégé, il devient difficile d'appliquer à l'étude de la dispersion des graines les modèles génétiques issus des études de flux de pollen. La diversité génétique d'une pluie de graines est donc un paramètre peu étudié et la plupart des études sont plutôt basées sur des modèles démographiques reposant sur des jeunes semis. Cependant, les quelques travaux menés sur la dispersion de graines d'espèces forestières anémochores permettent de tirer quelques conclusions.

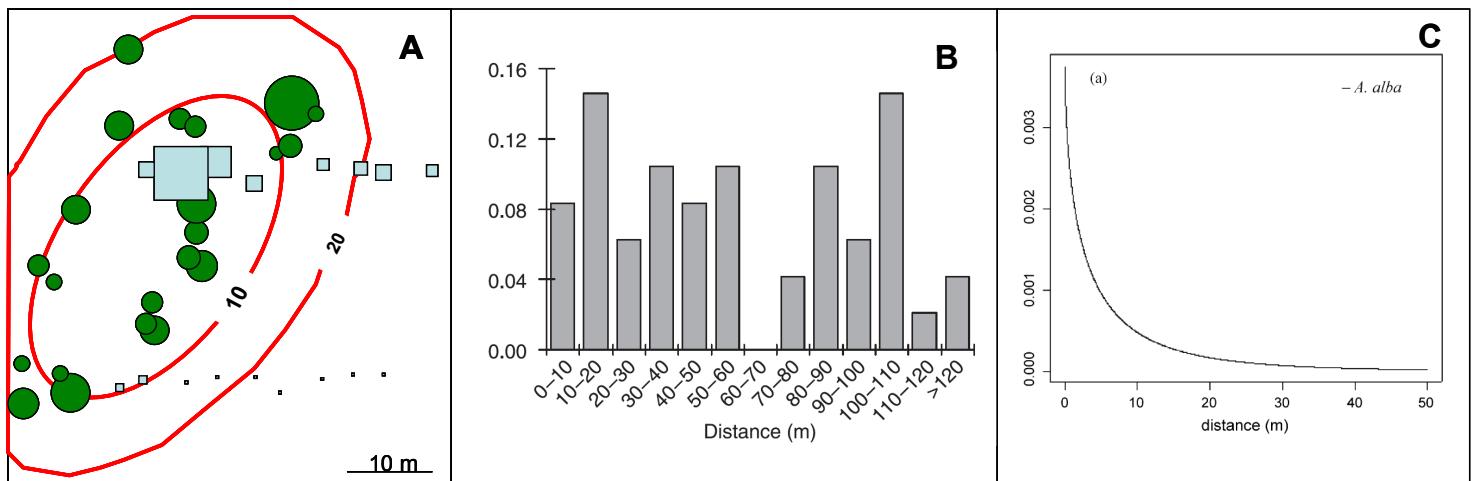


Figure I.9 : Représentation de la dispersion des graines pour 3 espèces anémophiles selon 3 méthodes différentes.

- Piegéages de graines dans un peuplement de *Pinus rigida*. (d'après Clark et al., 1998). Les cercles vert représentent les arbres, les carrés bleu les pièges à graines. La taille des symboles est proportionnelle à la taille de l'arbre ou au nombre de graines piégées. Les isocontours sont basé sur l'estimation de la fonction de dispersion.
- Evénements de dispersion observés dans un peuplement de *Pinus pinaster* Aiton (Gonzales-Martinez et al., 2006) à partir d'analyses de maternités réalisées sur semis.

Estimation de la courbe de dispersion des graines d'*Abies alba* par approche de modélisation inverse (Sagnard et al., 2007).

3.2 Flux de graines observés en peuplements forestiers

3.2.1 Une dispersion principalement à courte distance

L'assymétrie entre flux de pollen et flux de graines est fréquente chez les arbres forestiers (Streiff et al., 1998) et se traduit généralement par une distance de dispersion du pollen plus élevée que celle des graines, même si ces dernières peuvent migrer sur des distances parfois importantes. La plupart des études qui traitent de la dispersion des graines chez les espèces du genre *Pinus* prévoient un patron de dispersion décroissant avec la distance avec une majorité de graines dispersées à environ 30-40m de l'arbre mère (**Figure I.9**) Gonzales Martinez et al., 2006 pour *P. pinaster* ; Nathan et al., 2000 pour *P. halepensis* ; Guittet et Laberche, 1974 pour *P. sylvestris*). Cette dispersion à courte distance se traduit souvent, dans la régénération naturelle d'un peuplement, par une structuration génétique spatiale, c'est à dire une répartition non aléatoire des génotypes dans l'espace (Streiff et al., 1998, Epperson et Chung, 2001) qui génère la formation de groupes d'individus apparentés à l'échelle de quelques dizaines de mètres (Vekemans et Hardy, 2004). Les différentes interventions sylvicoles réalisées ensuite au cours du cycle sylvicole pourront contribuer à réduire (au moins en partie) cette structure spatiale. De nombreuses études montrent cependant que, d'une manière générale, cette structure bien que parfois considérablement réduite (Marquart et al., 2007), se maintient jusqu'au stade adulte du peuplement (Marquart et Epperson, 2004 ; Jones et al., 2006 ; Troupin et al., 2006).

3.2.2 Une dispersion à longue distance difficile à décrire

Les limites des études de dispersion, en particulier l'étude du processus sur de petites surfaces peuvent conduire à sous estimer les événements de dispersion à longue distance (Clarck et al., 1998). De plus, il réside une grande méconnaissance des processus de dispersion de graines à longue distance (Jordano et al., 2007) qui sont probablement gouvernés par des lois qui diffèrent de celles généralement utilisées dans les processus de dispersion (Nathan, 2006).

3.2.3 Une faible variabilité génétique pour la capacité de dispersion

La capacité de dispersion des semences peut être influencée par les caractéristiques physiques des graines (forme, poids, présence d'ailes, ...), par des vecteurs de transport divers (eau,

vent, animaux) parfois complémentaires et par les variations temporelles de ces vecteurs (Nathan et al., 1999). La topographie peut également jouer un rôle non négligeable, soit directement dans le cas de graines lourdes chutant au sol puis entraînées vers le bas en cas de pente forte (Oshawa et al., 2007), soit indirectement par les conditions aérologiques générées par la topographie (domaine qui demeure encore non documenté). Des travaux récents, analysant les vents et les caractéristiques aérodynamiques des semences, montrent que plusieurs types de facteurs peuvent modifier les courbes de dispersion des semences d'espèces anémochores :

- la structure du milieu (ouvert, fermé) agit sur les flux d'air, en particulier la vitesse horizontale des vents, et modifie les distances de dispersion des semences. Ces dernières sont considérablement réduites en milieu dense (Nathan et al., 2001 ; Horn et al., 2001).
- chez certaines espèces sérotineuses et anémochores, cas de nombreux pins, la capacité de rétention des graines dans les cônes encore fixés dans le houppier va de pair avec des mécanismes de dispersion liés à des facteurs environnementaux favorisant la libération des semences en condition optimale. Ces mécanismes peuvent également influer sur la distance de dispersion. Ainsi, chez le pin d'Alep, la distance de dispersion varie selon la saison et les conditions météorologiques, en particulier la température et l'humidité de l'air : des dispersions à des distances supérieures à 20m sont observées surtout en conditions chaudes et sèches (Nathan et al., 1999).
- la masse de la graine (sous fort effet maternel) est inversement proportionnelle à la capacité de dissémination chez le pin sylvestre (Debain et al., 2003a) et les caractéristiques associées à la dissémination (surface de l'aile, charge alaire en g/cm^2) sont beaucoup moins variables que la masse de la graine. Les différences au niveau des caractéristiques associées à la dispersion (surface de l'aile,...) ne modifient cependant pas les capacités de dispersion des individus (Nathan et al., 1996 ; Debain et al., 2003a), tant les turbulences aérologiques ont un effet prédominant (Greene et Jonhson, 1992).

3.2.4 Une anisotropie de dispersion difficile à mettre en évidence

La distance moyenne de dispersion ne constitue qu'une des dimensions spatiales du mouvement des graines. La direction de dispersion est également importante, notamment quand une régénération naturelle est recherchée à partir d'une source ponctuelle de

semenciers, dans le cas de régénérations par bandes par exemple. Les récentes études sur la dispersion des graines postulent le caractère isotrope du processus (Ribbens et al., 1994) et ne prennent pas en compte les écarts à ce postulat. Cette non prise en compte de la possible anisotropie du processus de dispersion des graines semble cependant plus due à des limites expérimentales qu'à une réalité biologique. Les données météorologiques traditionnelles fournies par les roses des vents ne suffisent pas à expliquer des dispersions de graines anémochores selon des directions privilégiées. L'intensité des vents doit également être prise en compte car la dispersion est plutôt associée à des épisodes de vents forts comme le suggèrent Wagner et al (2004). Des travaux de modélisation semblent par ailleurs indiquer qu'à faible distance de l'arbre mère, une dispersion isotrope (pas de direction privilégiée) s'avère plus efficace qu'une dispersion anisotrope pour mettre en place une régénération ; la tendance est inverse à plus longue distance de l'arbre mère. Ces résultats suggèrent que pour les espèces anémochores de type pionnières, comme le bouleau, la dispersion selon une direction privilégiée peut constituer un avantage pour installer une régénération (Wagner et al., 2004).

3.2.5 Influence de la structure du peuplement sur la dispersion des graines

Des travaux récents, analysant les caractéristiques des vents, montrent que plusieurs types de facteurs peuvent modifier les courbes de dispersion des semences d'espèces anémochores. La structure du milieu (ouvert, fermé) agit sur les flux d'air, en particulier la vitesse horizontale des vents, et modifie les distances de dispersion des semences. Ces dernières sont ainsi considérablement réduites en milieu dense (Nathan et al., 2001). Une étude récente de Schurr et al. (2008) basée sur des piégeages de graines établit la même relation : les arbres situés en milieu ouvert dispersent plus loin que les arbres situés en milieu dense. La prise en compte de cette densité d'arbres permet par ailleurs de comprendre les écarts entre capacités de dispersion estimées en peuplement et capacités estimées à partir des vitesses de recolonisation post-glaciaires (Schurr et al., 2008).

Si le poids des graines est reconnu comme étant sous fort contrôle génétique, il n'en va pas de même en revanche pour les variations individuelles de flexibilité des tiges et des branches qui peuvent avoir un effet important à lors de la libération de la graine. A l'échelle d'une parcelle de gestion, les conséquences de la structure (densité de tiges, hétérogénéité de hauteurs et rugosité du couvert) et de la composition du peuplement forestier (monospécifique ou

mélange d'espèces avec des caractéristiques différentes de houppiers) sur les mouvements d'air et donc la dispersion des semences restent toutefois encore largement inconnues. Une forte variabilité inter annuelle de la dispersion à longue distance

Les variations temporelles (inter saison, inter année) des caractéristiques météorologiques (force et direction des vents) affectent plus fortement la dispersion à longue distance que la dispersion à proximité immédiate des semenciers (Greene et Jonhson, 1992 ; Nathan et al., 2000). En outre la dispersion à longue distance dépendrait plus des conditions aérologiques (vitesses horizontales et verticales des vents), de la flexibilité des tiges et des branches que des caractéristiques intrinsèques des graines (Horn et al., 2001 ; Nathan et al., 2000). La synchronisation de libération des graines lors de vents favorables constituerait dans ce cas un mécanisme de contrôle efficace pour augmenter la distance de dispersion chez certaines espèces comme le pin maritime.

3.3 Bilan sur les flux de graines

La dispersion efficace des graines (et son corollaire la mise en place de semis naturels) constitue l'étape finale des flux de gènes au sein des peuplements forestiers conduits en régénération naturelle. Les nombreuses limites des études expérimentales de dispersion de graines rendent toutefois difficiles la mesure de l'influence de la gestion forestière sur ce processus biologique. Ces limites peuvent en effet considérablement réduire la portée des résultats car :

- elles négligent les variations qui existent entre les populations, d'ordre génétique ou de structure (peuplements purs ou mélangés, réguliers ou non), ou celles liées aux écarts interannuels de fertilité, qui sont souvent fortes dans le cas des arbres forestiers;
- la capacité de dispersion des graines à longue distance chez de nombreuses espèces forestières et la gestion d'unités spatiales de faible taille unitaire (quelques hectares) doivent conduire à ne pas sous-estimer les évènements de dispersion à longue distance;
- limitées aux piégeages, elles s'intéressent peu ou pas à la dispersion efficace des graines qui est celle qui intéresse au premier plan le gestionnaire forestier. La capacité du milieu à retenir les graines à leur point d'arrivée, à favoriser leur germination et la croissance des jeunes plantules sont pourtant primordiales et ne doivent pas être négligées (Clark et al., 1999a ; González-Martinez et al., 2002 ; Sagnard et al., 2007).

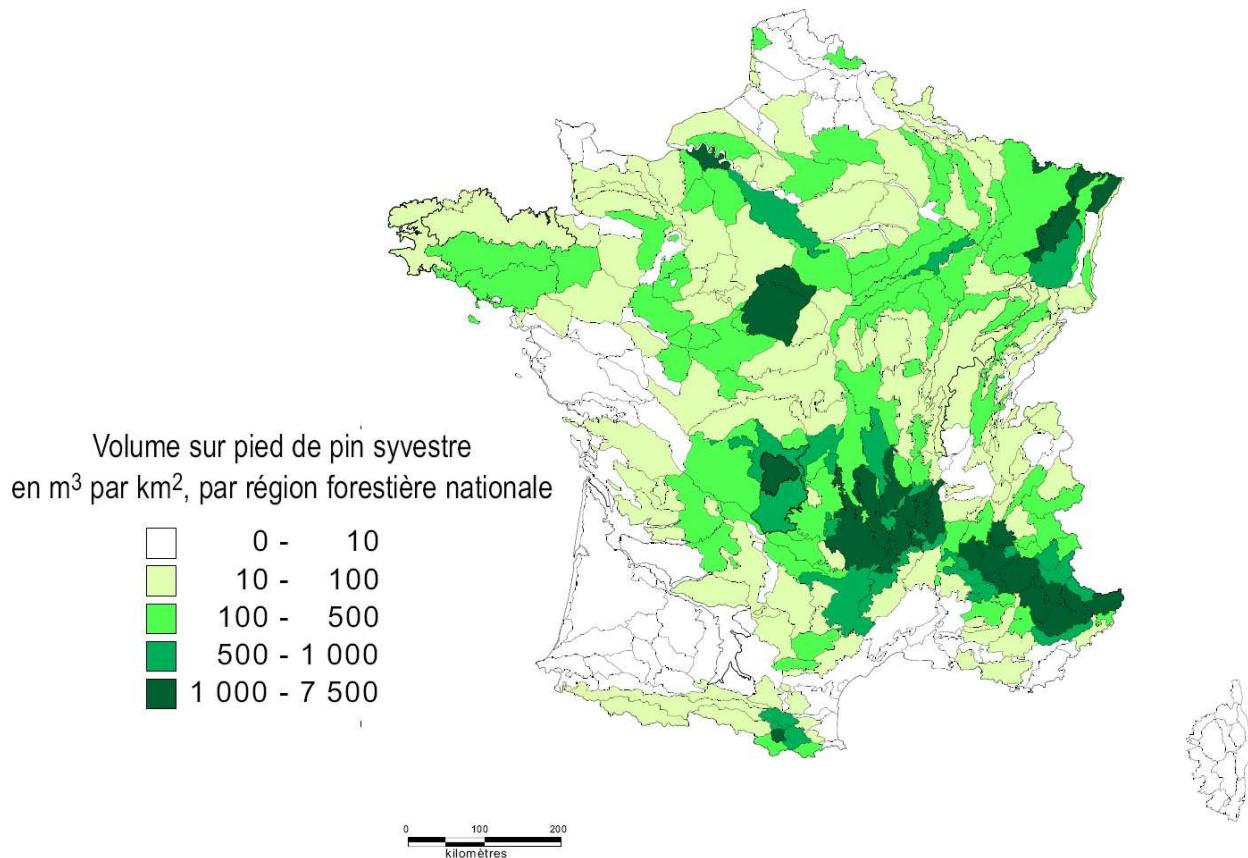


Figure I.10 : Répartition et abondance du pin sylvestre en France (Source IFN, 2001).

La dispersion à courte distance peut engendrer la mise en place d'une structure génétique spatiale, qui semble diminuer ou disparaître au cours des interventions sylvicoles (éclaircies) successives. Bien que le patron de dispersion des graines ait été décrit dans de nombreuses études, on ne connaît pourtant pas l'incidence de la structure spatiale du peuplement adulte sur la structuration génétique spatiale de la régénération naturelle issue de la dispersion des semences. De plus, cette dispersion étant relativement limitée dans l'espace, on s'attend à ce que le patron spatial d'abondance des graines soit relativement identique à celui des adultes (Clark et al., 1999b). Or, à notre connaissance, aucune étude ne tente de mettre en relation la structure spatiale du peuplement adulte et la structure spatiale de la pluie de graines, la plupart des travaux tentant de décrire la dispersion à longue distance ou des évènements de colonisation. La dispersion à courte distance, qui permet la mise en place de la régénération, est pourtant le phénomène qui intéresse directement le gestionnaire forestier : elle concerne en effet l'essentiel de la production de semences, contrairement aux évènements rares de dispersion à longue distance qui portent sur des quantités trop faibles de semences pour provoquer une régénération quantitativement acceptable par le gestionnaire soucieux de renouveler son peuplement.

Il apparaît donc nécessaire de préciser l'influence de la structure du peuplement sur la production de semences (aux plans quantitatif et qualitatif) et sur sa dispersion, cette étape précédant la germination et la croissance des plantules qui sont largement conditionnées par les caractéristiques du milieu (Gonzalez-Martinez et al., 2002) mais qui constituent le résultat final observé et recherché par le gestionnaire.

Au cours de cette thèse, nous essayerons donc de relier structure de peuplement et dispersion des graines. Les étapes suivantes, permettant de comprendre le cycle complet (survie et croissance des individus) ne pourront pas être abordées ici.

4. Optimiser la gestion de la diversité génétique lors de l'étape de régénération naturelle : cas du pin sylvestre

4.1 Le pin sylvestre : une aire naturelle fragmentée en France

Avec plus de près de 913 000 ha en 2001 (source IFN), le pin sylvestre est une essence résineuse majeure du paysage forestier français (**Figure I.10**). Il représente près de 9% du volume de bois sur pied disponible en France. 73 500 ha (6.4 %) de ces surfaces sont issus de

reboisements réalisés massivement depuis le milieu du XIXe siècle principalement sur les sols pauvres ou à tendance hydromorphe des régions de plaine du Nord de la France. Dans la moitié Sud de la France, le pin sylvestre constitue souvent l'essence prédominante des forêts d'altitude et de versant sec du Massif Central, des Pyrénées et des Alpes et occupe une aire appréciable en région bioclimatique méditerranéenne toujours dans l'étage montagnard. L'importante progression des surfaces couvertes, depuis le début du XXe siècle, s'expliquerait simultanément par une recolonisation naturelle liée à la déprise agricole et pastorale et par les efforts de reboisements passés.

L'aire naturelle du pin sylvestre, espèce sociale anémophile et anénochore, est la plus importante au sein du genre *Pinus* (**Figure I.3b**): 148° de longitude, du Portugal à la mer d'Okhotsh, 33° de latitude de la Sierra Nevada au Cap Nord. A l'échelle de la France, les seules populations naturelles du quart Nord-Est telles que Haguenau, Bitche ou Wangenbourg peuvent être rattachées à la partie continue de l'aire naturelle et considérées comme des populations quaternaires ayant évolué depuis environ 100 générations. Le pin de Haguenau représente ainsi la seule origine de pin sylvestre de plaine en France et constitue une ressource génétique autochtone originale, prioritaire à conserver car très menacée par la fragmentation des vieux peuplements d'origine autochtones. Par contre toutes les populations naturelles du Massif Central, du Sud des Alpes et des Pyrénées peuvent être considérées comme des reliques d'âge tertiaire s'étant réfugiées à des altitudes supérieures à 1000 m durant les périodes interglaciaires et qui sont redescendues plus récemment (**Figure I.3a** ; Cheddadi et al., 2006 ; Lange et Weibmann, 1988). Elles constituent pour la France les populations les plus méridionales au sein d'une aire naturelle fragmentée.

4.2 Le pin sylvestre : une espèce largement utilisée en reboisement

La généralisation des échanges de matériel forestier (graines, plants) d'un massif, d'une région, d'un état, voire d'un continent à l'autre et l'impact des flux de gènes issus de ces transferts sur les ressources génétiques locales constituent l'une des principales menaces identifiées sur les ressources génétiques forestières (Ledig, 1992). Conséquence de tels échanges, les massifs forestiers européens apparaissent le plus souvent constitués d'une mosaïque de boisements composée i) de plantations d'espèces autochtones ou exotiques, à but de production intensive de bois généralement constituées avec du matériel issu de diverses provenances ou amélioré dans le cadre de programmes de sélection ; ii) des peuplements

autochtones soumis à une gestion multifonctionnelle ; iii) de zones non exploitées, souvent à des fins de protection de milieux (Vallance, 1999 ; Lefèvre, 2004). Les incidences génétiques consécutives aux introductions à grande échelle de matériel végétal forestier sont de divers ordres : i) la modification du patrimoine génétique des populations indigènes par celui de populations non indigènes de la même espèce, ou par celui de variétés améliorées incluant ou non des hybrides non indigènes et capables de croisements avec les populations locales ; ii) le caractère invasif des espèces introduites et ses conséquences directes sous la forme de l'élimination des espèces indigènes par effet de compétition.

Le pin sylvestre a depuis très longtemps été utilisé comme essence de reboisement avec comme conséquences des transferts de matériel végétal (graines, plants) à longue distance entre zones autochtones et zones de reboisements (Bartoli et Demesure-Musch, 2003 ; Rosenstein, 1993), mettant alors artificiellement en contact des boisements d'origines géographiques éloignées (Voccia, 2005). Ces transferts ont parfois été massifs dans certaines régions de plaine où des peuplements feuillus souvent ruinés, présentant de nombreuses trouées ou clairières, ont été ensemencées ou plantés de pins, d'origine et de provenances diverses, à partir du XIX^{ème} siècle (Domet, 1862, Lefebvre, 1885). Une origine donnée de pin sylvestre (autochtone ou non) peut ainsi, même au sein de vastes massifs forestiers, être présente sous la forme de boisements ponctuels isolés les uns des autres par des peuplements constitués d'autres espèces ou d'autres provenances de pin sylvestre. Dans ce contexte, on peut s'attendre d'une part à des flux de gènes entre provenances dus aux transferts de matériel végétal plus ou moins raisonnés et contrôlés, tout comme la diminution des flux de gènes au sein de populations autochtones consécutivement à la destruction ou au morcellement de leurs habitats naturels. On peut donc s'interroger sur la dynamique des ressources génétiques du pin sylvestre dans le paysage forestier actuel.

4.3 L'action du gestionnaire

Si la qualité phénotypique et l'état sanitaire d'une pineraie adulte sont satisfaisants, le gestionnaire décide généralement de la renouveler par régénération naturelle : « ... *la régénération naturelle sera privilégiée pour le renouvellement de la majorité des peuplements de pin sylvestre pour lesquels un objectif pin sylvestre reste de mise. Avant de choisir cette voie, on s'assurera cependant que le peuplement en place est de bonne qualité phénotypique.* » (ONF-Guide pineraies des plaines du Centre et du Nord-Ouest, Chabaud et

Nicolas, à paraître). De plus, lors de cette mise en régénération, le gestionnaire a généralement pour seul objectif d'obtenir « *...un bon éclairement du sol pour permettre l'apparition et le développement des semis. Un bon repère pour y parvenir est de raisonner en proportion de la surface terrière initiale du peuplement à laisser à l'ensemencement. On peut ainsi considérer que seul 1/3 du capital initial doit rester sur pied pour permettre un ensemencement. Pour un peuplement à capital moyen, cela correspond à une surface terrière après ensemencement de l'ordre de 8 à 12 m²/ha. Cela revient à laisser entre 40 et 80 arbres/ha, densité à moduler selon le développement des houppiers*

Dans une approche de ce type, généralement appliquée dans la gestion courante des forêts, le nombre d'adultes, à relier au nombre de semenciers potentiels, fait uniquement référence à une densité d'arbres à l'hectare qui assure un bon éclairement du sol. L'accent est donc mis d'une part sur la source de graines (les arbres mères ou semenciers) considérée dans sa globalité (la contribution cumulée des semenciers plus que leur variabilité individuelle) et d'autre part sur les conditions de développement des semis après dispersion des graines. La caractérisation de cette source de graines semble toutefois limitée aux seuls arbres présents sur la zone à régénérer dont le nombre (et éventuellement la répartition spatiale pour maximiser la couverture du sol afin que la régénération puisse se mettre en place en tout point de la parcelle) doit assurer une production suffisante de semences. La prise en compte des boisements entourant l'unité de gestion à régénérer dans la rédaction des guides de sylviculture est très récente : « *La qualité génétique d'une régénération naturelle... dépendra donc en partie de ces apports issus des parcelles voisines, et ce d'autant plus que la parcelle à régénérer sera de faible surface, avec des effets de lisière importants (forme irrégulière ou en bande). Un diagnostic des parcelles environnantes est donc nécessaire avant de décider du choix du mode de renouvellement*

Ciblant les seuls arbres mères, le gestionnaire néglige le plus souvent l'importance de la phase de pollinisation qui précède la production des graines. La source de pollen n'est donc caractérisée ni par son origine ni par sa production ni par sa composition et aucune règle de gestion pratique n'aborde ce point pourtant capital. Par exemple, l'impact éventuel de la réduction du nombre de reproducteurs sur la diversité du nuage pollinique (et conséutivement celle du lot de graines) est ignoré.

Si la présence de boisements voisins sexuellement matures commence à être intégrée dans le schéma de décisions techniques qui conduit à la mise en place d'une régénération naturelle, la répartition spatiale des tiges dans la zone à régénérer n'est que rarement abordée. En futaie régulière monospécifique, il est généralement conseillé de privilégier une répartition homogène des semenciers censée favoriser une mise en place des semis naturels aussi homogène que possible (en quantité). Même si les peuplements mélangés font aujourd'hui l'objet d'un regain d'intérêt, les itinéraires techniques de conduite d'une régénération naturelle demeurent balbutiants et de nombreuses questions demeurent encore non résolues comme le nombre et la taille de trouées à créer dans le peuplement pour favoriser l'arrivée des semis, la position de ces trouées par rapport aux sources de graines. Les incidences génétiques de tels choix ne suscitent en outre guère de questionnements des gestionnaires.

En conclusion, l'évaluation du potentiel reproducteur d'un peuplement forestier à renouveler et l'adaptation des méthodes de mise en régénération pour garantir la qualité génétique de la population de semis recherchée demeurent des champs encore négligés de la part des gestionnaires. Pourtant le souci croissant du maintien des capacités adaptatives des peuplements face aux changements globaux souligne l'intérêt d'une meilleure maîtrise des incidences génétiques des modes de conduite sylvicole lors de la mise en œuvre de régénérations naturelles.

4.4 Objectifs de la thèse

Gérer durablement les ressources génétiques nécessite de connaître et de quantifier la diversité génétique existante mais aussi et surtout de comprendre sa dynamique, en conditions "naturelles" ou sous l'action de l'homme. La qualité génétique (hétérozygotie, consanguinité, introgression) d'un peuplement dépend de la qualité des graines dont il est issu. La phase de régénération, de la graine au semis recruté, constitue donc l'étape clé de la dynamique forestière qu'il s'avère essentiel d'étudier pour comprendre les variations spatio-temporelles des flux de gènes et leurs conséquences sur les écosystèmes forestiers. De plus, la part croissante prise par la régénération naturelle dans le renouvellement des peuplements forestiers amène à se poser la question de la gestion de la diversité génétique lors de cette étape.

Bien que la modélisation s'intéresse depuis longtemps à la dynamique démographique des peuplements, les modèles ont longtemps sous estimé les variations du régime de reproduction

Thématique de recherche: Flux de gènes et gestion des ressources génétiques forestières
Contexte: Diversité génétique du pin sylvestre lors de la phase de régénération naturelle
Objectifs: Comment intégrer dans les pratiques de gestion l'environnement des parcelles à différentes échelles pour maximiser la qualité de la régénération naturelle ?

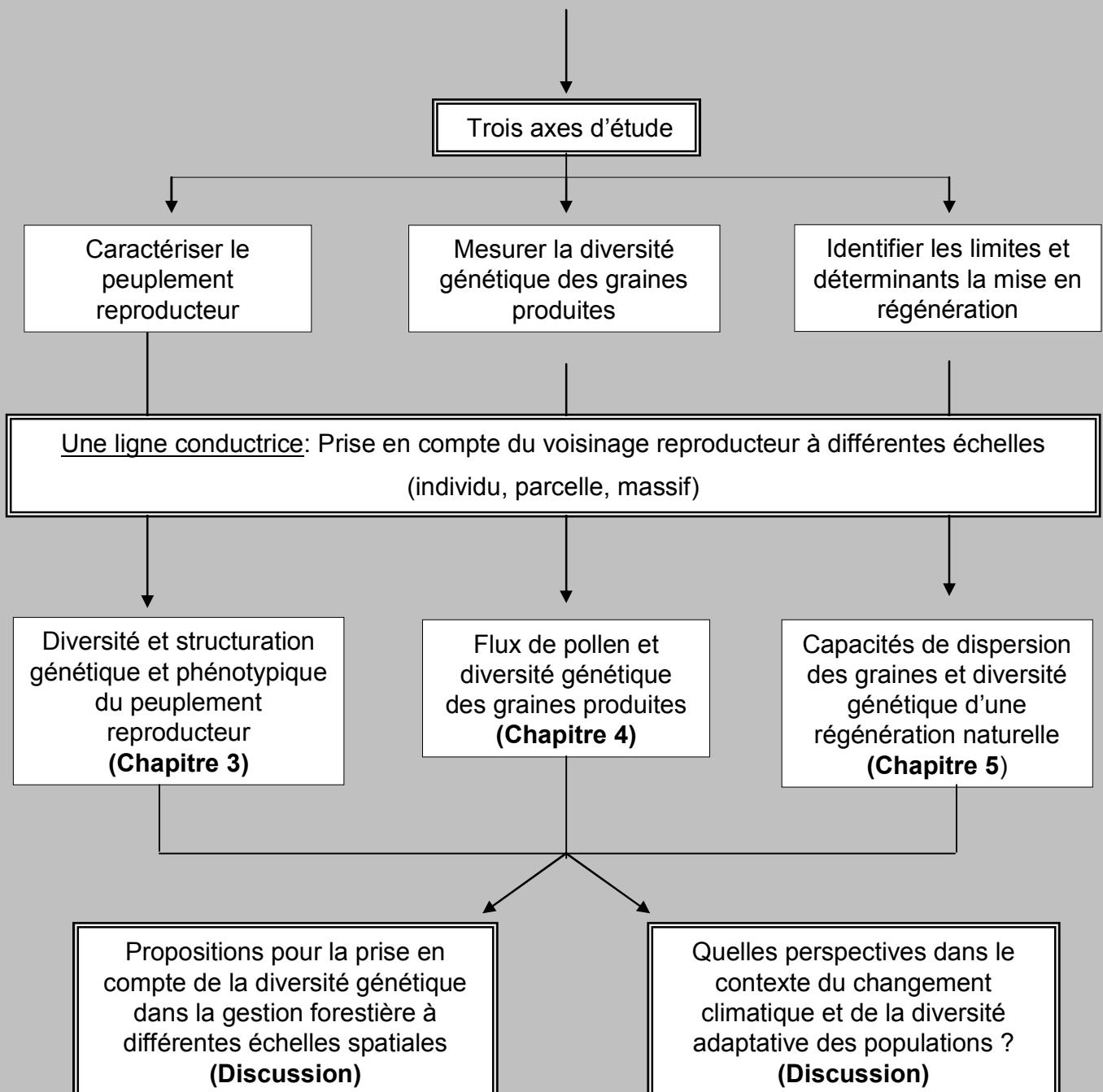


Figure I.11 : Démarche et structuration de la thèse

et les flux de gènes en ne s'intéressant bien souvent qu'à la dynamique intra parcelle, véritable unité de gestion sylvicole. Gérer et conserver les ressources génétiques nécessite pourtant de prendre en compte les flux de gènes à longue, voire très longue, distance et de travailler à l'échelle du massif et non plus uniquement à celle de la parcelle. De plus, par le biais des processus démo-génétiques, on s'attend à ce que l'hétérogénéité des structures détermine la diversité génétique et son organisation dans le peuplement (effet par exemple de la densité locale sur les flux de gènes et le régime de reproduction). En retour, la diversité génétique détermine la dynamique du peuplement (effet de la consanguinité sur la survie et la croissance). Dans les travaux sur la dynamique génétique des peuplements forestiers, la structure (futaie, peuplement irrégulier, contexte environnemental proche et lointain) et les objectifs sylvicoles de la parcelle sont rarement décrits ; leurs résultats sont ainsi difficilement déclinables en guides pratiques pour le gestionnaire de terrain.

Cette thèse vise à ajouter une nouvelle dimension spatiale et temporelle aux précédentes études sur les flux de gènes chez les arbres forestiers en s'intéressant aux échanges à longue, moyenne et courte distance dans un peuplement reproducteur hétérogène (différence de structuration spatiale et de densité des reproducteurs à différentes échelles). Notre objectif est de comprendre les mécanismes de la dynamique de la diversité génétique en régénération naturelle en fonction de la structure des peuplements à différentes échelles spatiales (locale ou massif). L'approche retenue sera décomposée selon les deux processus qui participent à la dynamique de la diversité génétique et qui sont à la base de la régénération des peuplements : les flux de pollen et les flux de graines (**Figure I.11**).

La connaissance des déterminants de chacun des processus permettra de cibler les paramètres sur lequel le forestier peut influer (densité et répartition spatiale de tiges, composition des boisements à l'échelle d'un massif) et qui sont à même de modifier les flux de pollen et de graines. Nous souhaitons alors définir des règles simples de prise en compte de la diversité génétique dans les actes de gestion courante pour limiter les risques liés à certaines pratiques sylvicoles.

Dans ce travail, je ne m'intéresserai qu'à la première phase de la régénération, de la formation de la graine à sa dispersion. L'ensemble des processus qui conduisent au recrutement et à la croissance des semis ne sera pas abordé ici. Le processus décrit sera donc un processus potentiel qui ne prend pas en compte les effets micro-environnementaux qui peuvent modifier la structuration spatiale lors du passage entre un flux potentiel (dispersion des graines) et un flux réalisé (régénération acquise).

Chapitre II

Matériels et méthodes



Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Les sites expérimentaux

Ce travail de thèse s'appuie sur deux sites expérimentaux (**Figure II.1**) présentant des situations contrastées. Le premier, composé de trois parcelles contigües de pin sylvestre au sein du massif de Haguenau, avait pour objectif de suivre la mise en place d'une régénération naturelle à partir d'une ressource génétique autochtone fragmentée au sein du massif. Le deuxième site, en forêt d'Orléans, s'intéresse à la mise en place d'une régénération dans un peuplement mélangé chêne-pin relativement isolé d'autres sources de pin sylvestre et avec des densités d'individus variables localement.

1.1 Le pin sylvestre du massif de Haguenau

1.1.1 Présentation du site expérimental

Le pin sylvestre de Haguenau, originaire du massif du même nom d'une surface de 20 909 ha et situé au nord de la plaine d'Alsace, constitue la seule origine autochtone de pin sylvestre de plaine en France. Les tests de provenance montrent que dans la moitié Nord de la France, les pins de cette origine possèdent une vigueur supérieure aux autres provenances naturelles françaises et étrangères (Birot et Lacaze, 1981 ; Bastien communication personnelle). Cette vigueur supérieure, signe d'adaptation locale, a d'ailleurs valu au pin sylvestre de Haguenau l'identification d'une région de provenance spécifique « PSY-205 Plaine de Haguenau ». Cependant cette ressource génétique originale reste menacée par une fragmentation croissante des parcelles autochtones au sein du massif. Des reboisements importants, réalisés après 1870 sous forme de semis ou de plantations denses, avec de nombreuses origines non autochtones (identifiées ou non) sont aujourd'hui à l'origine de risques importants d'introgression (Voccia, 2005) (**Figure II.2**). De plus la tempête de décembre 1999 a contribué à réduire considérablement les surfaces couvertes par les peuplements autochtones très âgés encore sur pied (**Figure II.3**). Pour la forêt indivise de Haguenau (une des 23 forêts du massif), la carte de présence du pin sylvestre établie en 1843 constitue l'état de référence (état « zéro ») généralement admis des boisements autochtones ; hypothèse est donc faite que tout pin sylvestre âgé de plus de 160 ans est autochtone. En forêt indivise de Haguenau sont donc considérées comme autochtones les unités de gestion constituées soit de tiges âgées de plus de

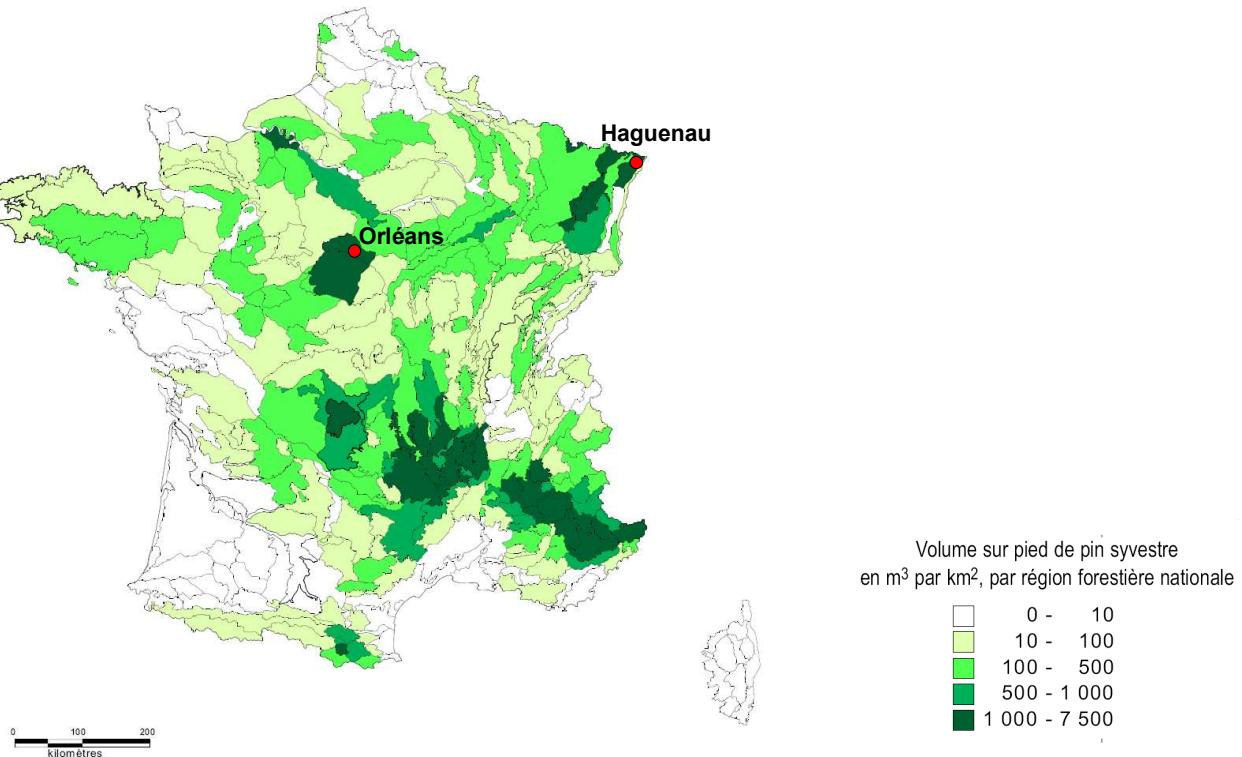


Figure II.1 : Localisation des deux sites d'étude sur la carte de répartition du volume sur pied de pin sylvestre sur le territoire Français (IFN, 2001).

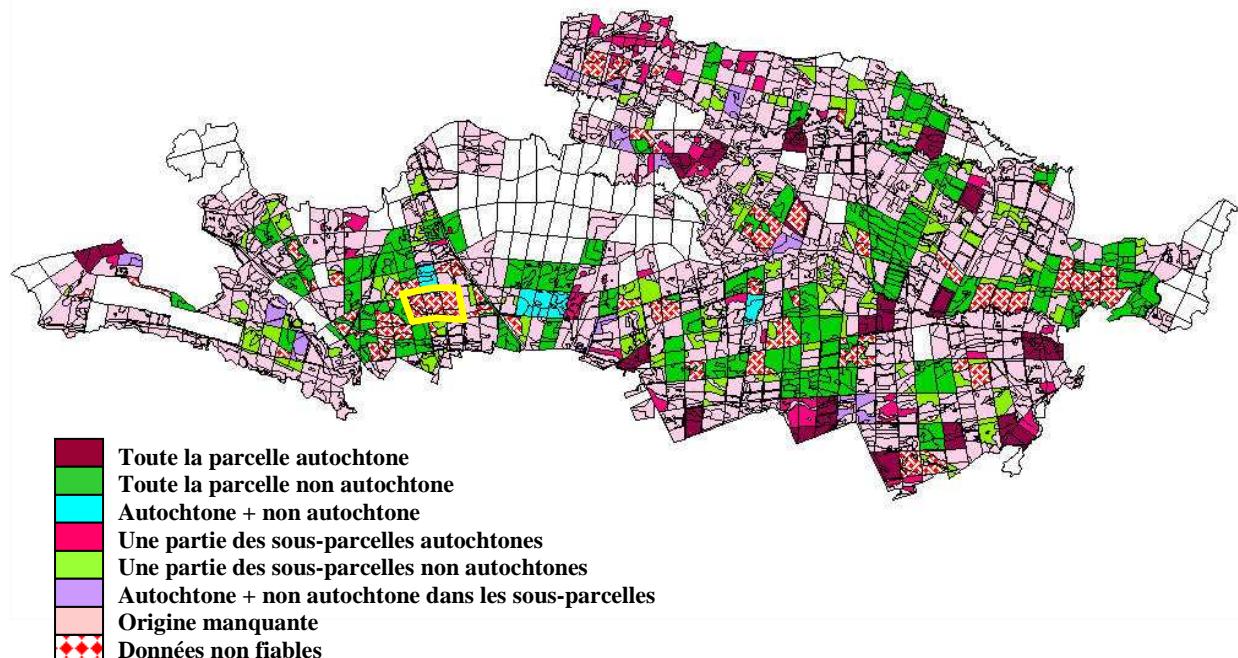


Figure II.2 : Origine géographique des boisements de pin sylvestre de la forêt indivise de haguenau (Voccia, 2005). En blanc absence de pin sylvestre. Noter l'abondance de parcelles avec une origine géographique non fiable ou manquante ainsi que la fragmentation de la ressource autochtone au sein du massif. Le rectangle jaune correspond à nos trois parcelles d'étude.

160 ans (antérieures à 1870) soit de boisements artificiels plus récents mais dont l'origine autochtone est reconnue sans aucun doute.

Le massif forestier de Haguenau s'étend entre 110 et 200m d'altitude, sur des sols acides, pauvres chimiquement et majoritairement hydromorphes, développés sur des alluvions fluviales sablo-argileuses du Pliocène et du Quaternaire. La température annuelle moyenne est de 10,1°C et le déficit hydrique pendant la saison de végétation atteint 141mm.

Notre étude s'appuie sur trois parcelles contiguës couvrant une superficie totale de 78 hectares (26 ha par parcelle) et composées d'un peuplement âgé de pins sylvestres autochtones et de hêtres en sous-étage. Ce groupe de parcelles, situé au cœur du massif, est partiellement entouré d'unités de gestion composées soit de jeunes boisements de pin sylvestre non fructifères (au nord et à l'est) soit de parcelles adultes de pin sylvestre très fortement touchées par la tempête (au sud) (**Figure II.4**). Suite à la tempête de 1999, ces parcelles présentent un gradient de densité variant de 12 à 50 tiges/ha. La parcelle la plus à l'Est (n° 1062) a été fortement affectée par la tempête de 1999 alors que celle la plus à l'Ouest (n° 1064) n'a été que peu touchée et conserve une densité d'individus relativement similaire à celle présente sur l'ensemble du massif avant tempête (**Figure II.5**).

1.1.2 Objectifs des études

La tempête de 1999 a considérablement réduit la densité de reproducteurs de façon locale et la ressource génétique originale que constitue l'origine Haguenau est dispersée au sein de peuplements de pins de diverses origines géographiques. Aussi l'étude menée en forêt de Haguenau vise à évaluer les possibilités de renouvellement de cette ressource autochtone en utilisant la régénération naturelle dans les parcelles autochtones âgées du massif. La situation particulière rencontrée à Haguenau nous a conduits à nous intéresser aux deux questions suivantes :

(1) évaluer l'influence de la structure du peuplement reproducteur sur le niveau de diversité génétique de la régénération mise en place. Ces résultats permettront de préciser l'influence potentielle de la répartition spatiale des reproducteurs sur la dispersion du pollen et des graines, sur la structuration spatiale de la diversité génétique des semis et sur la dynamique temporelle de la diversité génétique des zones de semis. Il s'agit de mettre en évidence si la densité locale d'arbres reproducteurs peut être limitante pour assurer une régénération présentant un niveau de diversité génétique suffisant.

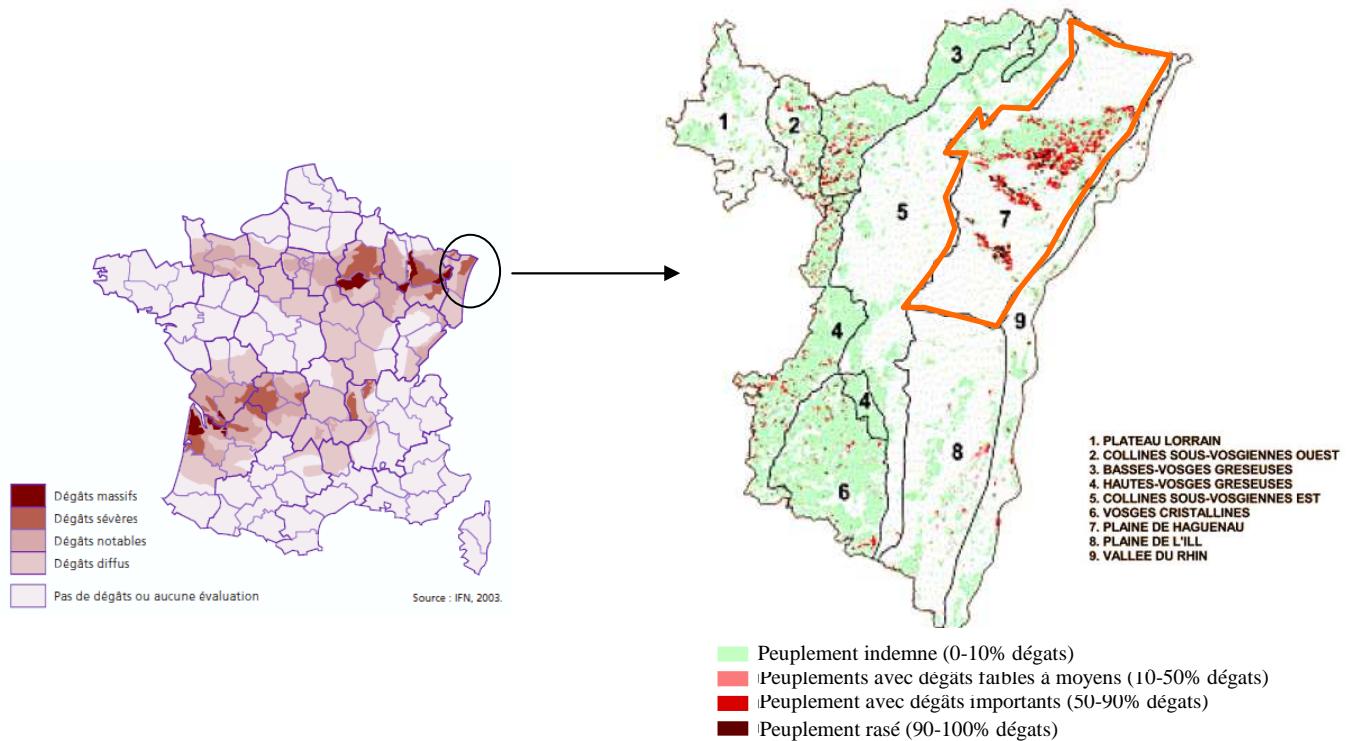


Figure II.3 Cartographie des dégâts de la tempête de Décembre 1999 en France et particulièrement sur le département du Bas-Rhin (IFN, 2003). Noter l'importance des dégâts dans la plaine de Haguenau.

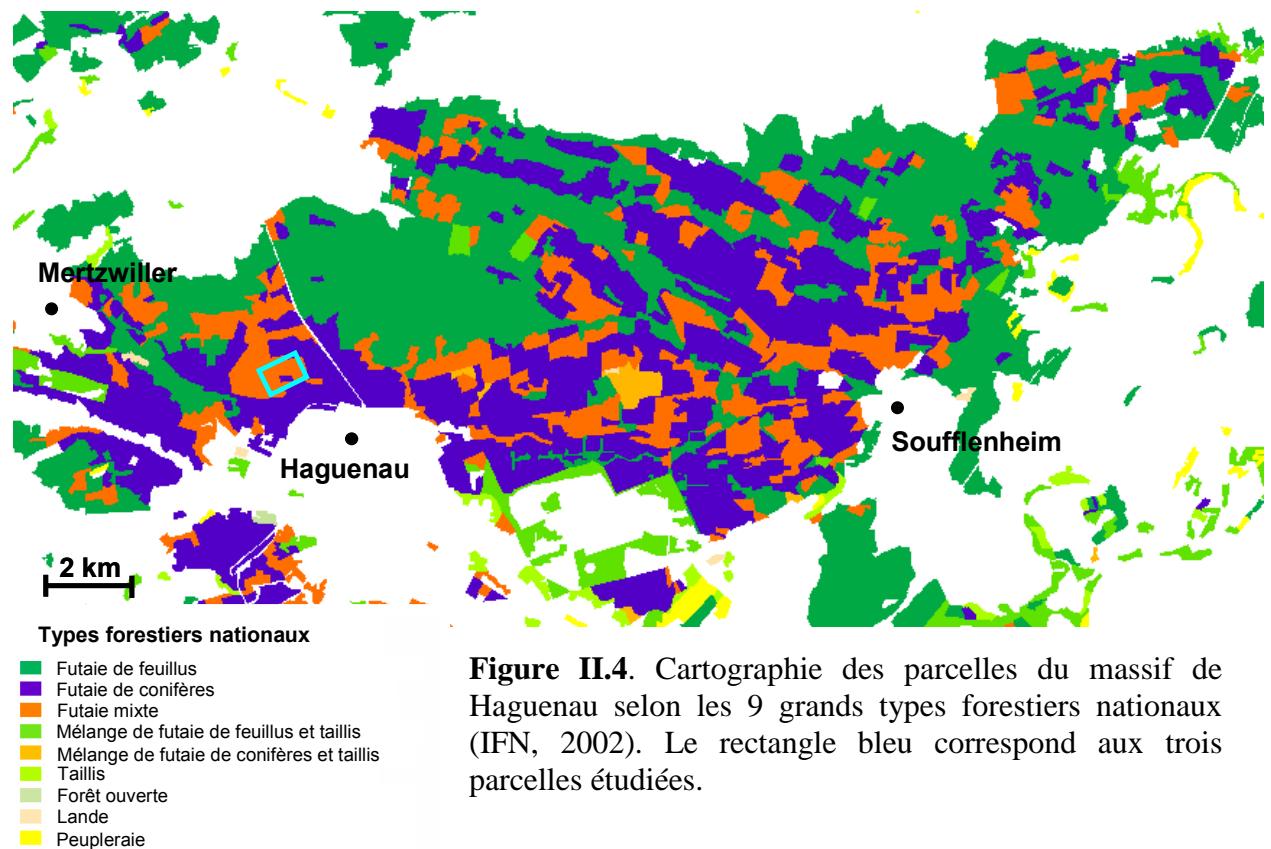


Figure II.4. Cartographie des parcelles du massif de Haguenau selon les 9 grands types forestiers nationaux (IFN, 2002). Le rectangle bleu correspond aux trois parcelles étudiées.

(2) caractériser l'influence de la structure du voisinage en portant une attention toute particulière aux flux de gènes entre boisements de parcelles proches. Ces résultats devraient permettre de préciser les stratégies de gestion et de conservation d'une ressource génétique autochtone fragmentée.

1.1.3 Matériel végétal

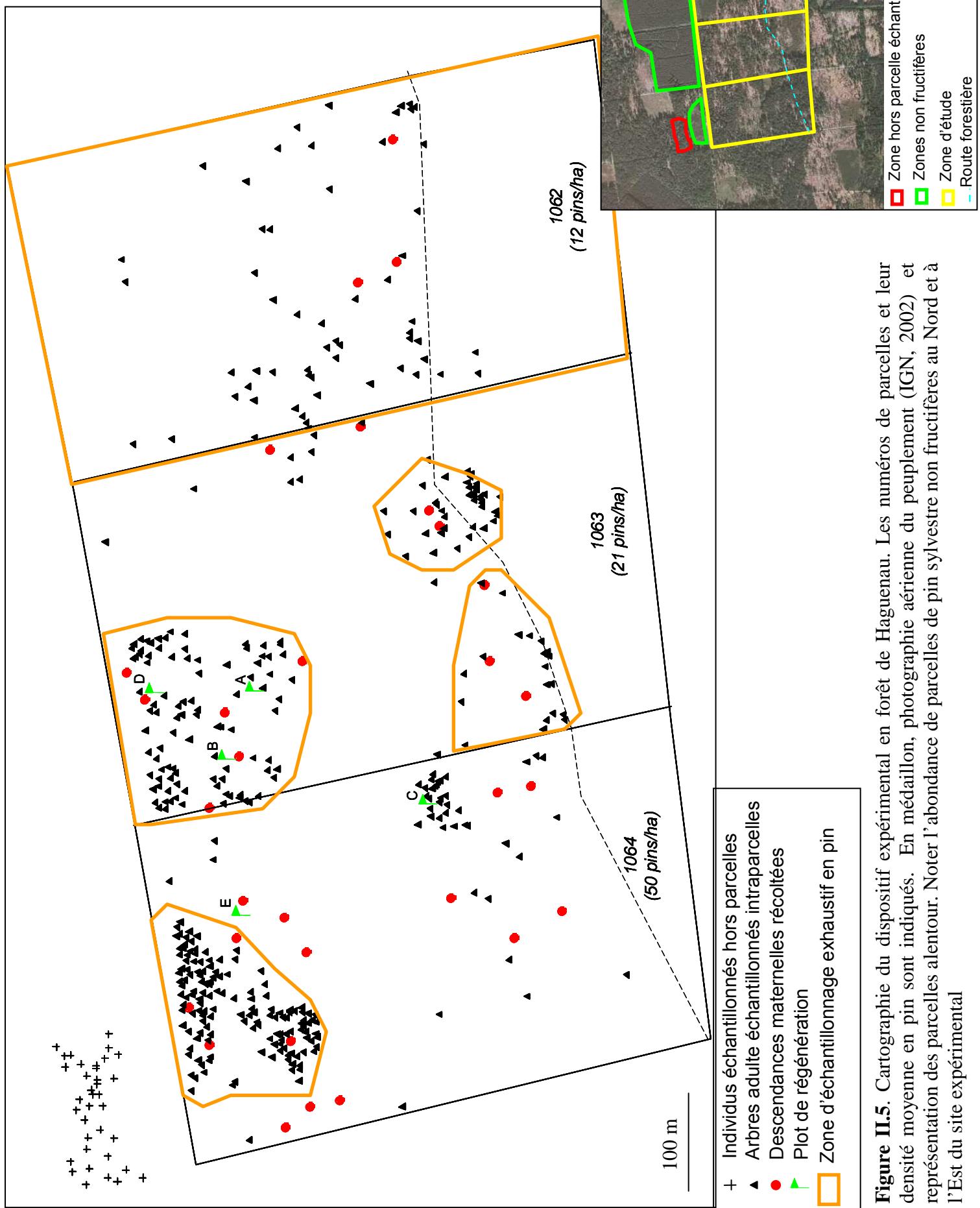
Arbres adultes

Au sein de ces trois parcelles, 459 pins sylvestres adultes de plus de 140 ans ont été inventoriés et géoréférencés pour cette étude (**Figure II.5**). Dans la parcelle 1062, la totalité des pins sylvestres encore sur pied a été échantillonnée. Dans les deux autres parcelles, quatre zones ont fait l'objet de relevés exhaustifs de tous les arbres adultes. Les surfaces restantes ont fait quant à elles l'objet d'un échantillonnage systématique d'intensité relativement lâche (1 arbre tous les 30 à 50m). Les 459 arbres adultes ainsi identifiés ont tous fait l'objet de prélèvement d'aiguilles ou de cambium pour analyse moléculaire. Il convient de noter que l'environnement proche de nos parcelles d'étude est majoritairement composé de jeunes peuplements non fructifères au nord et à l'est et de parcelles fortement affectées par la tempête au sud (**Figure II.5**).

De façon à caractériser la diversité génétique du voisinage reproducteur proche, 36 arbres ont été échantillonnés dans la parcelle la plus proche, d'origine toutefois inconnue. Ces 36 arbres ont tous fait l'objet d'une récolte d'aiguilles pour analyse moléculaire.

En plus de ce matériel végétal adulte spécifique à l'étude, nous disposons (**Figure II.5**) :

- d'un échantillon de 42 arbres adultes, initialement répartis sur les trois parcelles d'étude mais disparus au cours de la tempête de décembre 1999. Ces arbres font partie de la population d'amélioration de base réunie en 1985 à partir de différentes parcelles autochtones du massif. Ils permettent notamment de comparer la diversité génétique avant et après tempête.
- De la collection de 116 clones de pin sylvestre sélectionnés phénotypiquement en 1985 dans 22 autres parcelles autochtones de la forêt indivise de Haguenau (**Annexe 1**). L'ensemble de ces génotypes permettront de caractériser la ressource autochtone à l'échelle du massif du massif. Ils constituent par ailleurs la population parentale du verger à graines installé dans le Lot et fournissent depuis 2007 de la graine authentifiée d'origine Haguenau.



Descendances maternelles

Afin de caractériser l'ampleur des flux de pollen, un sous-ensemble de 31 des 459 arbres adultes mentionnés ci-dessus, réparti sur les trois parcelles (**Tableau II.1**), ont fait l'objet de récolte de descendances maternelles par tir au fusil en 2004 pour génotypage. Pour chacune des descendances maternelles constituées de 30 à 50 cônes, les graines ont été extraites, triées (graines vides et pleines), et dénombrées avant stockage en chambre froide et génotypage. De façon à donner plus de puissance aux analyses de paternité, nous nous sommes assurés du géoréférencement et de la prise en compte dans l'échantillonnage de la population adulte de tous les pères potentiels dans un rayon minimum de 50m autour de chaque arbre-mère. Pour certains d'entre eux inclus dans les zones d'inventaire exhaustif, le voisinage pris en compte est plus grand (**Figure II.5**).

Suivi de jeunes semis issus de régénération naturelle

La qualité génétique de la régénération naturelle qui se met en place dans un peuplement peut être appréciée à la fois par son niveau de diversité génétique moyen mais aussi par la structuration spatiale de cette diversité et enfin par l'évolution dans le temps de ces caractéristiques. Une approche combinant génétique et démographie (démogénétique) a donc été initiée sur 5 plots de régénération de pin (numérotés A à E) mis en place au sein des trois parcelles étudiées (**Figure II.6**). Chaque plot, d'une superficie de 5 à 18m², a fait l'objet du suivi précis de la survie et du développement des semis de pin sylvestre entre 2003 et fin 2006. Les plots A à D ont été installés fin 2003 en différents points du site où la mise en place de jeunes semis de l'année était significative. Le plot E correspond à une zone ouverte du peuplement dans laquelle une régénération significative s'était mise en place suite à la tempête de décembre 1999. A la mise en place de l'expérience, les semis 2003 mais aussi des semis plus âgés issus d'évènements de dispersion 2002 et 2001 ont été dénombrés, mesurés en hauteur et localisés au sein de plusieurs cadres de 1m² subdivisés en 100 cases de 10x10cm (**Figure II.7**). Deux fois par an (Juin, Novembre), un nouvel inventaire complet de ces zones de régénération a été réalisé afin de suivre le développement des semis précédemment identifiés et l'apparition de nouveaux semis issus d'évènement de dispersion plus récents.

La liste du matériel végétal inclus dans l'étude de la diversité génétique au sein d'une régénération naturelle dans ce site de Haguenau est résumée dans le **tableau II.1**. Le génotypage de tous les individus (adultes, graines, semis) a été réalisé à partir de récolte de différents tissus (aiguilles, embryons, cambium).

Type de matériel		Nombre	Objectifs de l'étude
Adultes reproducteurs	Eliminés par la tempête de 1999	42	
	Echantillonnés en 2004 et 2006	417	
	Voisinage de la parcelle 1064	36	
	Total	116	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi de floraison in situ • Structuration spatiale de la diversité génétique • Flux de gènes intra- et inter-parcelles
Descendances maternelles	Parcelle 1062	3	
	Parcelle 1063	13	
	Parcelle 1064	15	
	Total	31	<ul style="list-style-type: none"> • Caractérisation de la production de graines • Flux de pollen et Régime de reproduction
Jeunes semis issus de régénération naturelle	Plot A : semis 2003	65	
	Plot B : semis 2003	59	
	Plot C : semis 2003	65	
	Plot D : semis 2003	60	
	Plot E : semis 2000	49	
Total		298	<ul style="list-style-type: none"> • Diversité génétique au sein de jeunes semis naturels • Flux de gènes (pollen et graines) réalisé • Evolution démographique d'une régénération naturelle

Table II.1. Matériel végétal inclus sous forme d'arbres adultes, descendances maternelles ou de jeunes semis, dans l'étude de la diversité génétique au sein d'une régénération naturelle dans le massif de Haguenau. Tous les individus référencés dans ce tableau ont fait l'objet de prélèvement de tissus vivants (aiguilles, cambium ou embryons) pour génotypage.

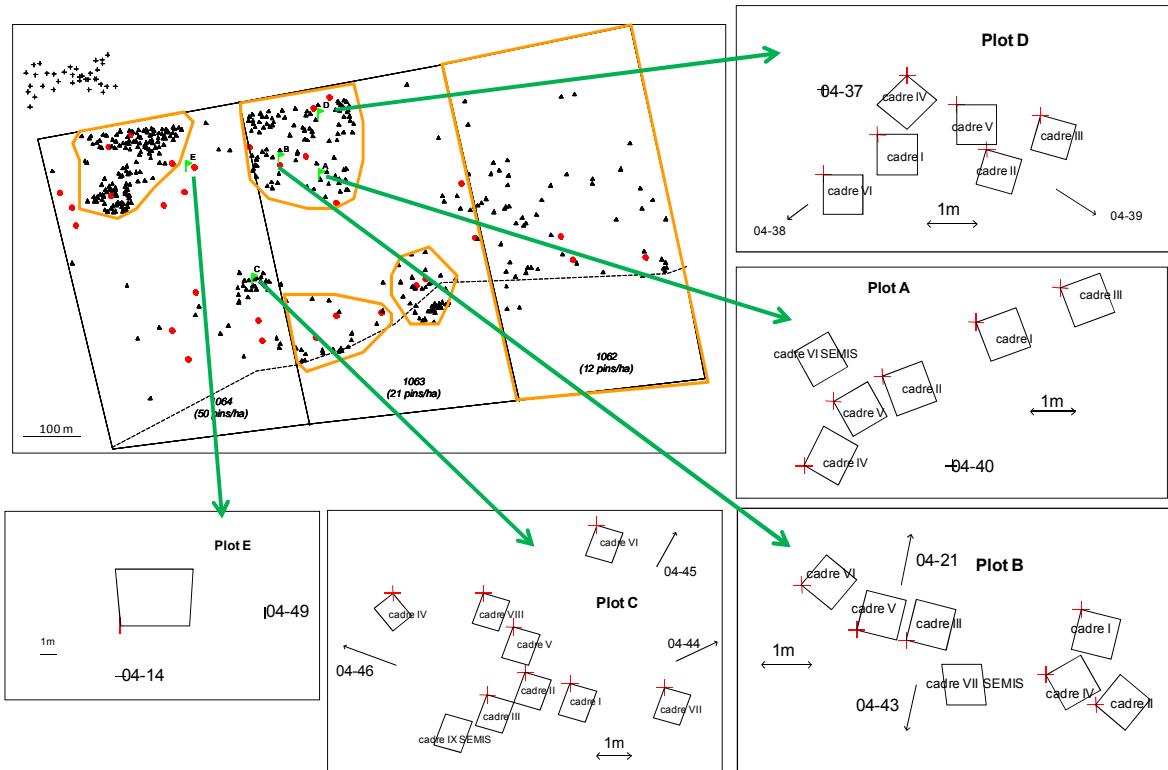


Figure II.6. Présentation des zones d'échantillonnages de semis naturels de pin sylvestre au sein des 5 plots de régénération étudiés. Dans les plots A à D, chaque cadre couvre une surface de 1m². Dans le plot E, le quadrilatère représente la zone de 18m² échantillonnée. Les angles de chaque cadre ont été géoréférencés par rapport aux pins adultes les plus proches.

1.1.4 Observations réalisées sur le matériel végétal

Diversité génétique neutre et diversité adaptative, composantes de la variabilité intraspécifique et de l'adaptation à un environnement changeant, tous ces paramètres utilisés pour décrire une ou plusieurs populations peuvent être décrits à différents niveaux : à un locus ou plusieurs loci répartis sur le génome pour représenter la variabilité entre génotypes ; pour un caractère ou une série de caractères pour représenter la variabilité entre phénotypes.

Dans ce travail où sont comparées des populations d'arbre adultes, de graines, de jeunes semis, nous avons utilisé deux types de descripteurs :

- des marqueurs moléculaires, qui permettent de mesurer la diversité génétique neutre, de réaliser des analyses de parenté et de suivre l'impact des forces évolutives, notamment la migration à travers les flux de pollen et de graines ;
- des caractères morphologiques ou traits d'histoire de vie permettant de décrire la population de reproducteurs et différents déterminants biologiques potentiels des flux de pollen et de graines réalisés. Une attention particulière a été portée au choix de caractères facilement mesurables par les gestionnaires et pour toutes les situations de peuplement possibles.

1.1.4.1. Description de la variabilité phénotypique pour différents caractères

Les observations réalisées ont été concentrées sur différents caractères liés à la reproduction et directement susceptibles d'affecter la production de semences destinée à assurer le renouvellement du peuplement adulte.

* Variabilité des caractéristiques de floraison de la population adulte

Dans le cadre de l'analyse de la mise en place d'une régénération naturelle, nous avons cherché à caractériser les floraisons mâle et femelle de la population d'arbres adultes, ceci sur plusieurs années de façon à évaluer l'ampleur de la variation interannuelle. Nous avons donc évalué l'abondance et la phénologie de floraison mâle et femelle de 59 pins sylvestres adultes répartis au sein des trois parcelles et ce pendant trois années consécutives (2004 à 2006). L'observation de l'intensité de floraison sur ces vieux arbres adultes n'est pas chose aisée et n'a pu être approchée ici qu'à partir de notation en 4 classes après observation des houppiers à l'aide de jumelles (**Tableau II.2**). La phénologie de floraison a elle aussi été notée selon le



Figure II.7 : Plots de régénération D (gauche) et E (droite) photographiés en 2004. La photo au centre représente un cadre et son maillage utilisé pour la cartographie et le suivi des semis. Chaque angle du cadre en bois de $1m^2$ est géoréférencé dans le plot, puis les semis sont référencés à l'intérieur du cadre selon des coordonnées colonne-ligne correspondant aux 100 cases du maillage.

Note	Floraison mâle	Floraison femelle
0	Pas de fleurs	Pas de fleurs
1	Quelques fleurs dispersées dans le houppier	Quelques fleurs dispersées dans le houppier
2	Une fleur sur la moitié des pousses terminales	Une fleur par pousses terminale
3	Une fleur sur toutes les pousses terminales	Plus d'une fleur par pousses terminale

Tableau II.2. Définition des notations à 4 classes utilisées pour estimer l'abondance des floraisons mâle et femelle



Figure II.8: Echelles de notation à 4 classes utilisées pour évaluer la phénologie des floraisons mâle (haut) et femelle (bas) chez le pin sylvestre. Le stade 3 correspond pour les inflorescences mâles à la période d'émission de pollen, et pour les inflorescences femelles au stade de réceptivité maximale.

stade de développement des fleurs, noté de 1 à 4. La note attribuée à chaque individu correspond au stade atteint par la majorité des fleurs du houppier (**Figure II.8**).

* Variabilité des caractéristiques de fructification de la population adulte

En plus de la composante de floraison, les caractéristiques de la fructification sont importantes à prendre en compte pour préciser le succès reproducteur des individus. La production de graines pleines étant seule susceptible de se traduire par une production de semis, le dénombrement et le tri (graines vides et pleines) des graines extraites ont permis de mesurer un nombre moyen de graines pleines par cône, le taux de graines pleines et le poids de ces graines. Les graines ont ensuite été stockées en chambre froide avant génotypage.

1.1.4.2. Mesure de la diversité génétique neutre à l'aide de marqueurs moléculaires

Afin de décrire la diversité génétique neutre et sa structuration spatiale, nous avions besoin de marqueurs moléculaires adaptés. Ces marqueurs devaient également permettre de caractériser les flux de gènes et donc être suffisamment polymorphes pour discriminer les différents individus participant aux évènements de reproduction. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs types de marqueurs microsatellites développés chez le pin sylvestre ou transférés depuis d'autres espèces de pins.

* *Mise au point d'une méthode originale d'extraction d'ADN à partir de cambium*

Décrire la diversité génétique et identifier les flux de gène nécessitent de caractériser le génotype de nombreux individus. Au début de ce travail, l'extraction d'ADN était réalisée sur des aiguilles et nécessitait la récolte de rameaux par tir au fusil. C'est ainsi que les premiers arbres-mères ayant fait l'objet d'une récolte de descendances maternelles ont fait simultanément l'objet de récolte d'aiguilles avant extraction d'ADN selon une méthode classique utilisant un kit d'extraction Qiagen ®. Devant l'ampleur du travail que représentait la récolte d'échantillons sur de nombreux individus adultes par tir au fusil, nous avons décidé de mettre au point une méthode d'extraction de l'ADN à partir de cambium. Prélever le cambium de nombreux individus à hauteur d'homme avec un emporte-pièces s'avère nettement plus facile et rapide à réaliser sur le terrain (200-250 individus/jour) que le tir de rameaux, notamment en peuplements adultes de grands arbres, denses ou mélangés. Sur le site de Haguenau en mars 2006, le cambium de 417 pins adultes a été prélevé à l'emporte-pièce.

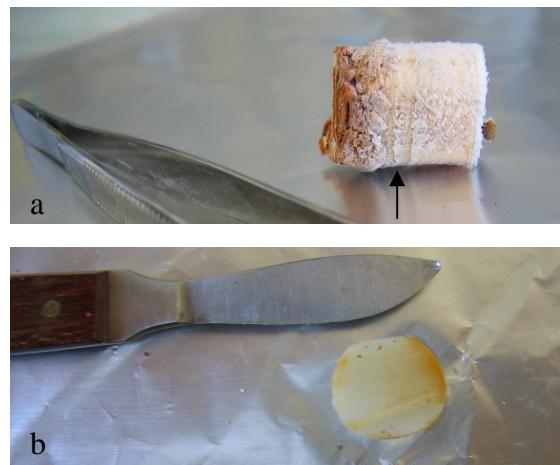


Figure II.9: Echantillon de bois prélevé sur arbres adultes à l'aide de l'emporte pièce (a) et disque de cambium utilisé pour l'extraction d'ADN (b). La flèche représente la position approximative du cambium dans l'échantillon.

Microsatellite	Espèce	Motif répété	Taille (pb)	H_e	Code GENBANK	Source
SPAC12.5	<i>Pinus sylvestris</i>	(GT) ₂₀ (GA) ₁₀	155	0,94a	AJ223772	Soranzo et al., 1998
SPAG7.14	<i>Pinus sylvestris</i>	(TG) ₁₇ (AG) ₂₁	209	0,92a	AJ223771	Soranzo et al., 1998
Pt_ctg4363	<i>Pinus taeda</i>	(AT) ₁₀	100	NA	BV728807	Chagné et al., 2004
Ptx3025	<i>Pinus taeda</i>	(TTG) ₇ ... (TTG) ₅	145	0,79b	AY304034	Auckland et al., 2002

Tableau II.3. Caractéristiques des 4 marqueurs microsatellites nucléaires utilisés. L'espèce citée est celle sur laquelle le microsatellite a été développé et la source correspond à la publication. H_e diversité génétique estimée (Nei 1973) chez le pin sylvestre d'après Robledo et al., 2004^a et Gonzales-Martinez et al., 2004^b. Le code GENBANK permet d'accéder à la description complète de chaque microsatellite sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>. NA donnée non disponible.

Deux à trois rondelles de 1,5cm de diamètre ont été prélevées sur chaque arbre, sur une profondeur d'environ 2,5cm sous écorce afin d'être sûr de prélever les tissus du cambium. Les échantillons ont ensuite été conditionnés à – 80 °C jusqu'à extraction de l'ADN. Celle-ci a été réalisée au laboratoire à partir d'un disque de cambium prélevé sur chaque arbre échantillon (**Figure II.9**) et est présentée en détails dans l'**Annexe 2**.

L'ADN des aiguilles des semis de plots de régénération et celui des graines a été extrait à l'aide du kit Qiagen ® selon un protocole classique identique à celui utilisé pour extraire l'ADN des aiguilles des individus adultes.

** Génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites*

Compte tenu de leur forte variabilité et de leur caractère neutre, les marqueurs de type microsatellites constituent des outils de choix pour l'analyse des flux de gènes. Deux types de marqueurs microsatellites ont été utilisés : des marqueurs nucléaires à hérédité bi-parentale et des marqueurs chloroplastiques haploïdes à hérédité paternelle chez les pins. La différence de mode d'héritabilité de ces marqueurs peut apporter des informations complémentaires pour caractériser la diversité génétique et sa structuration spatiale. De plus, les marqueurs chloroplastiques, à hérédité paternelle, sont particulièrement adaptés à l'analyse des flux de pollen.

L'ensemble des individus (graines, semis, adultes) a été génotypé avec 4 marqueurs microsatellites nucléaires développés chez *Pinus sylvestris* et *Pinus taeda* (**Tableau II.3**). Les protocoles détaillés d'amplifications sont fournis en **Annexe 3**. Les fragments microsatellites ont été analysés par un séquenceur automatique ABI 3100 (Applied Biosystems) avec l'étalon interne GeneScanROX-500. Pour chaque microsatellite, la ségrégation mendélienne avait préalablement été testée à l'aide de graines issues de croisements contrôlés (5 mères différentes et 10 graines minimum par croisement) pour les marqueurs SPAC 125, SPAG 714 et Pt_ctg4363. Cette ségrégation a également été testée dans le cadre de ce travail pour le marqueur Ptx3025. Les lectures ont été menées indépendamment par 2 personnes et l'attribution des allèles a été réalisée par analyse de la fonction de densité de la taille des fragments identifiés par le séquenceur (voir **Annexe 4**). Cette méthode associée à un séquençage d'allèle douteux permet notamment de diminuer le risque d'attribution de faux allèles rares.

La combinaison de plusieurs loci (non recombinants) constitue un marqueur de paternité de choix puisque le profil d'un individu (haplotype) correspond exactement à celui de son père

Microsatellite	Espèce	Motif répété	Taille (pb)	Nombre d'allèles	Source
Pt15169	<i>Pinus thunbergii</i>	(C) ₈ (T) ₈ A(T) ₈	118	5 ^a	Vendramin et al., 1996
Pt26081	<i>Pinus thunbergii</i>	(T) ₁₄	112	4 ^a	Vendramin et al., 1996
Pt30204	<i>Pinus thunbergii</i>	(A) ₁₂ (G) ₁₀	145	7 ^a	Vendramin et al., 1996
Pt36480	<i>Pinus thunbergii</i>	(T) ₁₁	147	3 ^a	Vendramin et al., 1996
Pt41093	<i>Pinus thunbergii</i>	(T) ₁₁	78	NA	Vendramin et al., 1996
Pt45002	<i>Pinus thunbergii</i>	(T) ₁₅	167	6 ^b	Vendramin et al., 1996
Pt71936	<i>Pinus thunbergii</i>	(T) ₁₆	148	6 ^a	Vendramin et al., 1996
Pt79951	<i>Pinus thunbergii</i>	(T) ₁₂	145	5 ^b	Vendramin et al., 1996
Pt87268	<i>Pinus thunbergii</i>	(T) ₁₄	165	5 ^a	Vendramin et al., 1996
PCP87314	<i>Pinus sylvestris</i>	(T) ₁₄	116	5 ^c	Provan et al., 1998

Tableau II.4. Caractéristiques des 10 marqueurs microsatellites chloroplastiques utilisés. L'espèce citée est celle sur laquelle le microsatellite a été développé et la source correspond à la publication. Le nombre d'allèles correspond à celui observé chez le pin sylvestre à chaque locus d'après Robledo et al., 2005^a ; Naydenov et al., 2005^b et Provan et al., 1998^c. NA donnée non disponible.

(Plomion et al., 2001 ; Provan et al., 2001). Dix marqueurs microsatellites chloroplastiques ont été retenus pour décrire la diversité génétique des apports paternels à la production de graines ou de jeunes semis (**Tableau II.4**). Les amplifications ont été réalisées selon deux multiplexages de 3 marqueurs (voir **Annexe 2**) et les fragments ont été analysés de manière identique à celle décrite pour les marqueurs nucléaires. Les lectures ont été menées indépendamment par 2 personnes pour limiter les risques d'erreur. Pour réaliser ensuite les différentes analyses génétiques, les allèles aux différents locus ont été combinés pour chaque individu afin de définir son haplotype. Seuls six de ces dix marqueurs ont été utilisés pour la suite des analyses (Pt15169, Pt26081, Pt30204, Pt36480, Pt71936, Pt87314), les quatre autres n'apportant aucune discrimination supplémentaire entre individus (marqueurs monophormes ou redondants avec les 6 retenus).

1.2 Les peuplements mélangés chêne-pin en forêt d'Orléans

1.2.1 Présentation du site expérimental

Les peuplements mélangés Chêne et Pin sylvestre constituent un bon exemple de peuplements "complexes". Ils couvrent une surface voisine de 50 000 ha dont près de 23 000 ha dans le Bassin Parisien (données IFN, mélanges pris en compte à partir d'une représentativité minimum de 25 %). Parmi eux, les peuplements de plaine étaient pour la plupart, à leur origine, des peuplements incomplets de chêne, présentant de nombreuses trouées ou clairières, qui ont été ensemencées ou plantées de pins, d'origine et de provenances diverses, à partir du XIX^{ème} siècle. Souvent, ces peuplements étaient considérés comme transitoires, leur rôle étant de reconstituer une ambiance forestière, permettant aux essences nobles (chêne, parfois hêtre) de s'installer et former en deuxième génération un nouveau peuplement complet monospécifique et régulier. Le forestier a donc généralement privilégié localement une essence au détriment de l'autre ; au mieux, il les a conduites de façon indépendante. Ces peuplements qui ont finalement perduré en tant que peuplements mélangés, du moins à l'échelle du paysage, ont acquis une valeur patrimoniale ; ils constituent maintenant l'identité de nombreux massifs forestiers comme celui d'Orléans. Par ailleurs, la sylviculture du pin sylvestre tend à se modifier selon plusieurs directions. En région Centre par exemple, il existe une volonté de diversification des sylvicultures des pins. Des sylvicultures alternatives à la gestion en peuplements purs et denses de pins sont développées : jusqu'alors largement plantée à partir d'origines génétiques diverses, cette essence tend de plus en plus à être

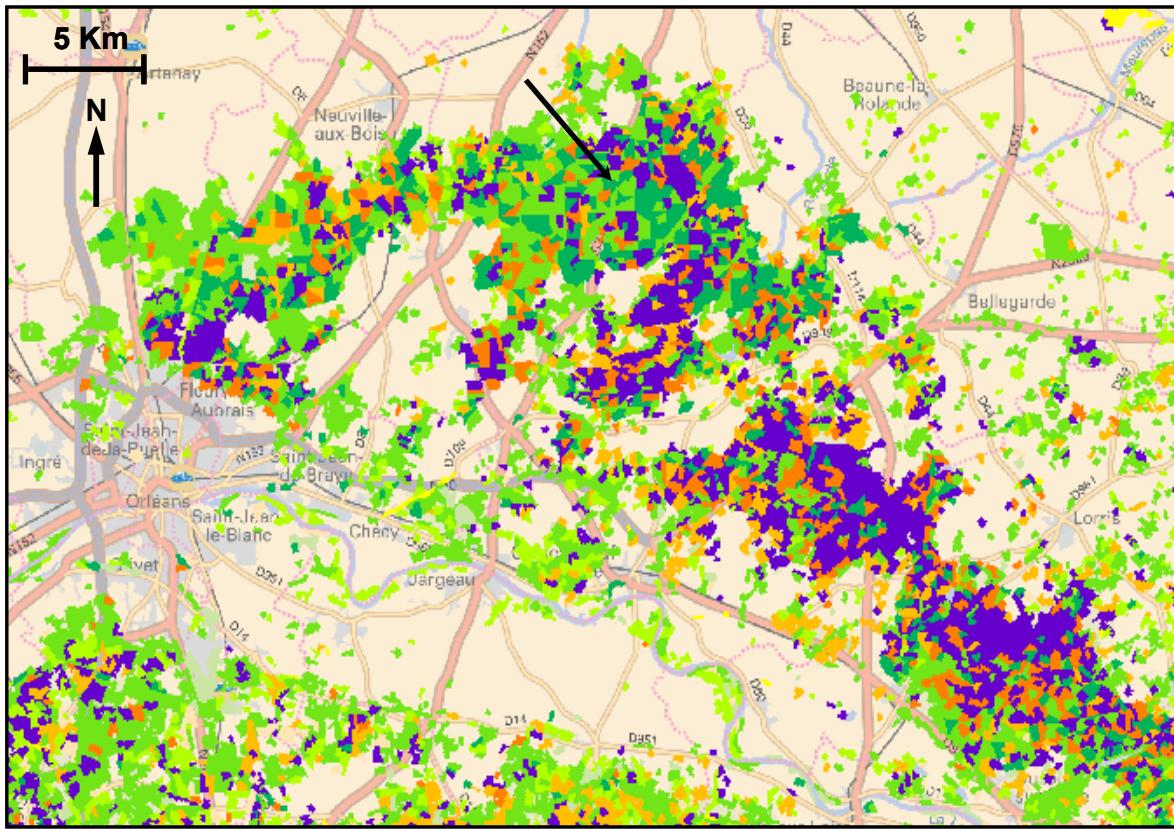


Figure II.10 Cartographie des parcelles de la forêt d'Orléans selon les 9 grands types forestiers nationaux (IFN, 2002). La flèche indique représente la position approximative de la parcelle 951. Noter la faible proportion de futaie de conifères dans le secteur étudié par rapport au secteur situé au Sud-Est du même massif.

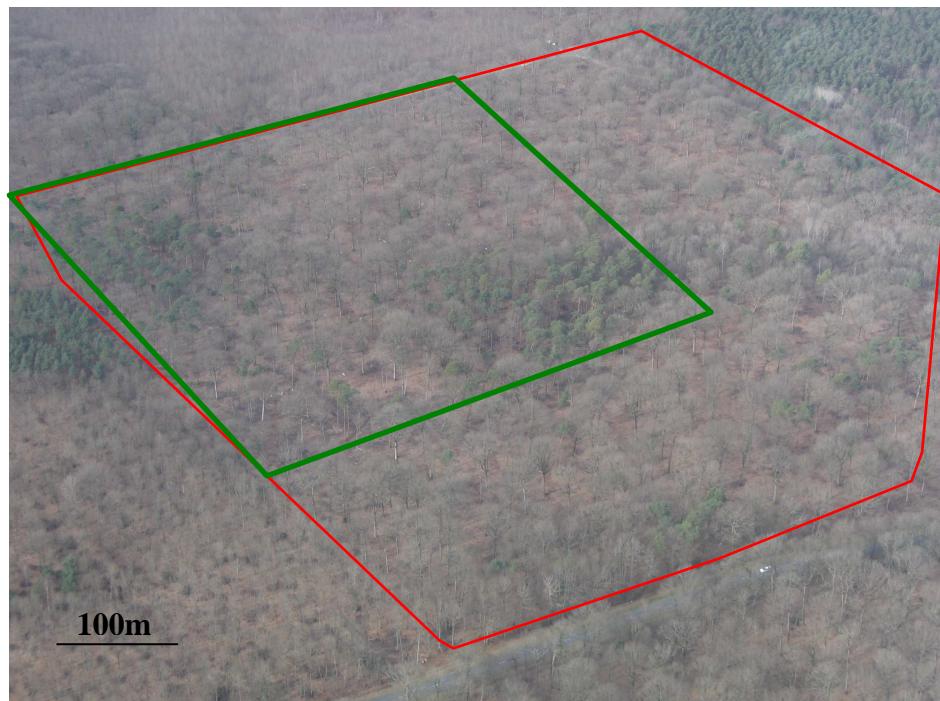


Figure II.11 : Photographie aérienne de la parcelle 951 (contour rouge). Les deux zones de pin sylvestre sont clairement identifiables. La zone de piégeage est représentée en vert. Noter la présence d'un jeune peuplement non fructifère situé au bas de la photographie. Les pins sylvestres situés en haut à droite de la photographie forment un groupe distant d'environ 200m de la zone d'étude.

régénérée par semis naturels. Les densités de peuplement sont en outre amenées à diminuer et l'on va probablement assister aussi, dans les décennies à venir, à une modification de la nature des peuplements (passage de peuplement de pin sylvestre pur à des peuplements mixtes chênes-pin sylvestre).

Les peuplements mélangés de chêne et pin de la forêt d'Orléans ne sont probablement pas aléatoirement répartis. Ils sont liés à des stations qui posaient des problèmes de reboisement au XIXème siècle (Domet, 1892 ; Lefebvre, 1885). Un certain nombre de cartes (dont Criés, 1869) sont d'ailleurs très utiles pour localiser l'emplacement des vides au XIX^{ème} siècle et des premiers boisements de pins. Des conditions pédologiques (hydromorphie surtout) et de concurrence interspécifique défavorables (espèces fortement concurrentielles telles que *Pteridium aquilinum*, *Molinia caerulea* et *Calluna vulgaris*) (Duchaufour, 1947) ont en effet rendu nécessaire le recours à cette espèce réputée frugale qu'est le pin sylvestre. Le massif d'Orléans étant situé en dehors de l'aire naturelle de répartition du pin sylvestre, les boisements réalisés avec cette espèce sont donc tous d'origine allochtone et des origines multiples y ont été introduites dès le début du XIX^e siècle, période où débuta l'aménagement de cette forêt (Voccia, 2005).

La forêt domaniale d'Orléans est constituée de 3 grands massifs qui couvrent un territoire de plaine (altitude moyenne : 140m) d'environ 35 000ha caractérisé par une quasi absence de topographie (70m de dénivellation), des sols d'épaisseur variable, généralement pauvres chimiquement, acides, plus ou moins hydromorphes et à réserve en eau faible à moyenne due à des textures à dominante sableuse, une température annuelle moyenne de 10,4 °C et des épisodes de sécheresse post printanière et estivale. Notre étude s'appuie sur la parcelle n° 951 (18ha) située dans la partie nord du massif d'Ingrannes (13 550ha) où le pin sylvestre est plutôt moins représenté que dans le reste du massif (**Figure II.10**). De plus, en raison de son caractère isolé (le premier peuplement de pins sylvestre est distant de 200m), cette parcelle constitue non seulement le reflet de la situation d'une partie des peuplements mélangés de la forêt d'Orléans mais aussi une situation expérimentale idéale pour l'étude des flux de graines, permettant de s'affranchir au moins en partie de l'influence des peuplements voisins (**Figure II.11**). La zone d'étude, d'une superficie de 7,5ha, est constituée d'une futaie mélangée chêne-pin sylvestre en cours de régénération où les deux espèces sont co-dominantes. L'importance relative des chênes varie au sein de la parcelle (surface terrière/ha de 2,5 à 20 m²), et les gros bois (diamètre supérieur à 50cm) et bois moyens (diamètre entre 30 et 50 cm) représentent l'essentiel des chênes du peuplement (63% et 34% respectivement). La majorité

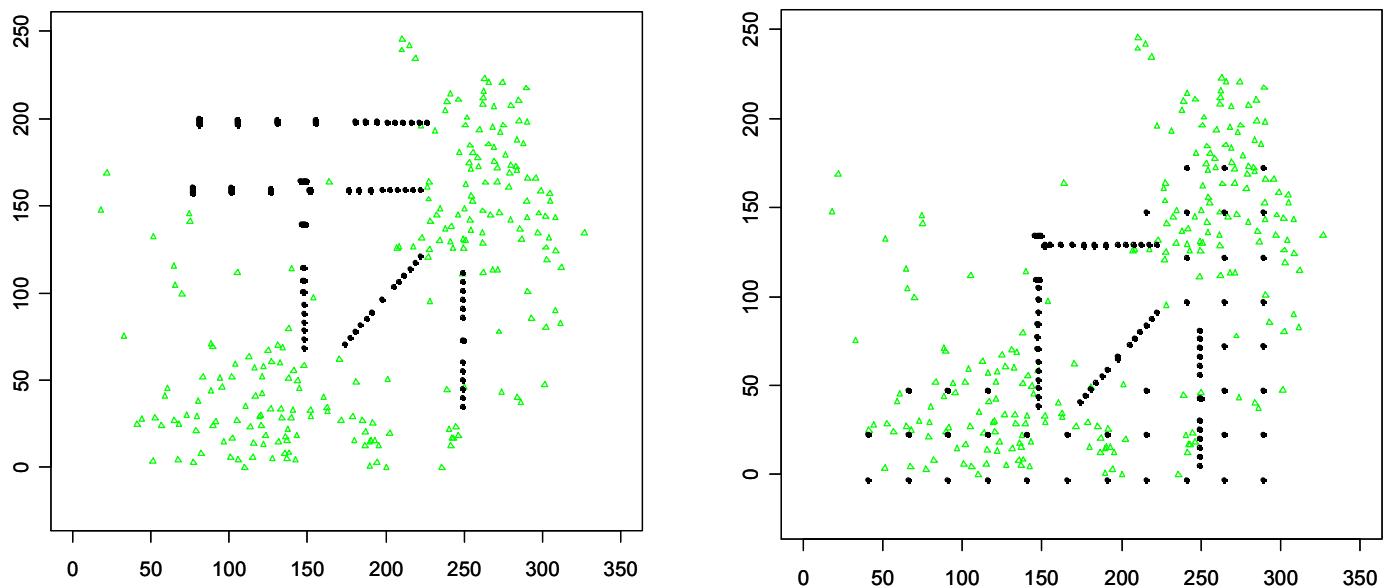


Figure II.12. Carte du site d'Orléans avec localisation de tous les pins sylvestres inventoriés et dispositifs de piégeage de graines installés en 2007 (gauche) et en 2008 (droite). Les points noirs représentent les pièges, les triangles verts les pins. L'augmentation de densité de pièges pour des distances moyennes est visible sur le dispositif de 2008 sur deux transects.

des pins est présente dans deux îlots semi-circulaires d'environ 50m de rayon composés de tiges de diamètre moyen 46,5cm et de hauteur dominante 31m. La structure spatiale du peuplement peut être assimilée à un type 3 d'après une classification des peuplements mélangés de la forêt d'Orléans (Ngo Bieng et al., 2006), où les pins sont agrégés et en répulsion avec les chênes.

1.2.2 Objectifs des études

L'étude menée sur ce site expérimental a pour objectifs i) de préciser le processus de dispersion des graines de pin sylvestre dans un peuplement mélangé caractérisé par une répartition spatiale irrégulière des reproducteurs, ii) d'évaluer l'hétérogénéité de la production de graines à l'échelle du peuplement et d'explorer les déterminants de cette hétérogénéité et iii) d'identifier, à l'usage des gestionnaires, des descripteurs de déterminants importants de la dispersion des graines, permettant d'assurer le succès d'une régénération naturelle.

Ne seront pas ici abordées les questions traitant des capacités de survie et de croissance des jeunes semis en fonction des conditions micro environnementales (type de couvert, intensité et qualité d'éclairement, type de végétation concurrente,...). Le processus décrit est donc un processus potentiel qui ne prend pas en compte les effets micro-environnementaux qui peuvent modifier la structuration spatiale de la régénération naturelle lors du passage entre un flux potentiel (dispersion des graines) et un flux réalisé (régénération considérée comme acquise).

1.2.3 Géoréférencement et caractérisation de la population d'arbres reproducteurs

Un géoréférencement exhaustif des 234 pins sylvestres adultes de la zone d'étude a été réalisé à l'aide d'un théodolite (**Figure II.12**). La cartographie obtenue montre une majorité de pins situés dans deux zones relativement denses et une minorité (41 au total) répartis dans des zones composées essentiellement de chênes.

La caractérisation du peuplement reproducteur porte sur des critères dendrométriques (diamètre individuel à 1,30m en cm) et sur l'intensité individuelle de fructification, directement susceptible d'affecter la production de graines. Etant donné que les pins sont co-dominants, avec des houppiers de tailles relativement similaires, on considère que



Figure II.13: Détails d'un piège à graines (à gauche). Le long d'un transect, le nombre de pièges posés augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne des zones denses en pins (à droite).

l’abondance de cônes est un bon indicateur de leur capacité de production de graines. Les arbres forestiers présentent non seulement une forte variabilité interannuelle de floraison mais aussi de fructification. De plus, la mise en place d’une régénération naturelle par un gestionnaire s’étalant généralement sur plusieurs années, il importe, comme pour la floraison à Haguenau, de caractériser au cours de plusieurs années la diversité phénotypique présente sur les caractéristiques de fructification. Nous avons donc mesuré l’abondance de la fructification individuelle de 170 pins sylvestres adultes répartis au sein des trois parcelles et ce pendant deux années consécutives (2007 et 2008). Les 41 arbres plutôt isolés font tous partie de cet échantillonnage. Dans les zones denses en pins, où l’observation des houppiers est difficile, des notations de fructifications ont été réalisées uniquement pour des arbres situés à moins de 30m de la lisière des ces deux zones. Le niveau individuel de fructification a été estimé à la jumelle selon une échelle de notation à 5 classes.

Toutefois, afin de préciser la capacité de production de graines pleines, qui constitue le caractère intéressant directement le gestionnaire, des descendances maternelles ont été récoltées chaque année (2007, 2008) sur 40 arbres sous forme de lots variant de 7 à 34 cônes par arbre (24 en moyenne). Les arbres récoltés ont été choisis pour couvrir le gradient d’abondance de cônes, et sont situés aussi bien en zones denses en pins qu’en situation isolée. Parmi ces 40 arbres, 30 sont communs aux deux années. Pour chacune des descendances maternelles, l’ensemble des graines produites ont été extraites, triées (graines vides et pleines) et dénombrées puis stockées en chambre froide. Le dénombrement et le tri (graines vides et pleines) des graines extraites ont permis de mesurer le nombre de graines pleines par cône, le taux de graines pleines et le poids de 1000 graines.

1.2.4 Dispositifs de piégeage de graines

Une fois réalisée l’inventaire et la cartographie du peuplement, nous avons mis en place deux dispositifs de piégeage de graines légèrement différents en 2007 et en 2008 (**Figure 2.12**). Les graines ont été piégées grâce à 120 pièges de $0,25\text{m}^2$ construits pour cette étude (**Figure 2.13**) et disposés pour répondre à deux objectifs :

i) En 2007, l’objectif était d’estimer la capacité de dispersion des graines à longue distance. Pour cela, les pièges ont été répartis le long de 5 transects partant des deux zones denses en pins considérées comme les deux principales sources de graines. Un piège a été placé tous les 5m pour des distances inférieures à 50m de la source, cette distance de 50m étant considérée comme seuil de dispersion (Camarero et al., 2005 ; Ribbens et al., 1994).

Variable	Description
N10	Nombre d'arbres dans un rayon de 10m
N15	Nombre d'arbres dans un rayon de 15m
N20	Nombre d'arbres dans un rayon de 20m
N30	Nombre d'arbres dans un rayon de 30m
N50	Nombre d'arbres dans un rayon de 50m
Dmin	Distance à l'arbre le plus proche (m)
D5	Distance moyenne aux 5 arbres les plus proches (m)
D10	Distance moyenne aux 10 arbres les plus proches (m)
D15	Distance moyenne aux 15 arbres les plus proches (m)
D30	Distance moyenne aux 30 arbres les plus proches (m)

Tableau II.5 : Définition des variables utilisés pour caractériser le voisinage reproducteur des pièges à graines

Pour les distances comprises entre 50 et 150m de la source, une série de pièges est placée tous les 25m. Afin de pouvoir capter les événements à longue distance supposés plus rares, le nombre de pièges par série augmente avec la distance à la source (de 2 à 8).

ii) Pour l'année 2008, une fois la capacité de dispersion à longue distance estimée à partir des piégeages de 2007, nous avons voulu préciser cette dispersion à moyenne et courte distance et connaître l'intensité de la pluie de graines dans des situations denses en pins. Pour cela, nous avons modifié le dispositif 2007 pour augmenter la densité de pièges pour des distances comprises entre 50 et 100m à partir des bouquets de pins. 65 pièges communs aux deux années sont donc répartis le long de 4 transects (un transect de 2007 a été enlevé) pour des distances allant jusqu'à 50m des zones denses. Douze pièges supplémentaires complètent ces transects pour des distances allant de 50 à 100m. Les 43 pièges restants sont placés sous les zones denses selon un maillage de 25 x 25m.

Chaque année, les pièges ont été récoltés tous les cinq jours entre début Mars et fin Juin. La récolte était arrêtée lorsqu'aucune graine supplémentaire n'était observée dans les pièges pendant 15 jours consécutifs.

1.2.5 Caractérisation de l'environnement des pièges à graines

Dans les peuplements mélangés, étant donnée la taille limitée de la source de graines, définir des prédicteurs de la pluie de graines est d'une importance considérable pour mener des stratégies de régénération efficaces. Puisque notre peuplement présente une forte hétérogénéité de la densité locale de pins, on s'attend à ce que la pluie de graines reflète ces variations de densité. Afin de mettre en relation le nombre de graines par piège et les caractéristiques du voisinage reproducteur, différentes variables ont été calculées pour chaque piège à partir des données géoréférencées (**Tableau II.5**). Le voisinage reproducteur peut ainsi être défini par la taille du voisinage (un effectif en pins adultes) dans un rayon donné variant de 10 à 50m dans notre étude (N10 à N50) et/ou par la distance moyenne à une source de taille variable, variant de 5 à 30 arbres dans notre cas (Dmin à D30).

1.2.6 Etude de la régénération naturelle

Pour caractériser la variabilité du processus de germination dans l'espace, qui permet le passage d'une dispersion potentielle des graines à une dispersion réalisée, un comptage de

Type de marqueur	Paramètre	Abréviation	Logiciel utilisé
Nucléaires	Nombre d'allèles par locus	A	GenAIEx 6.2
	Nombre efficace d'allèles	Ae	GenAIEx 6.2
	Nombre d'allèles avec fréquence >5%	$A_{5\%}$	GenAIEx 6.2
	Nombres d'allèles privés	Ap	GenAIEx 6.2
	Hétérozygotie observée	Ho	Fstat 2.9.3
	Hétérozygotie attendue	He	Fstat 2.9.3
	Déficit en hétérozygotes	Fis	Fstat 2.9.3
Chloroplastiques	Probabilité d'exclusion	EP	Cervus 2.0
	Nombre d'haplotypes	Nh	R Development Core Team
	Nombre d'haplotypes privés	Hp	R Development Core Team
	Nombre d'haplotypes uniques	H_1	R Development Core Team
	Nombre d'haplotypes avec fréquence >5%	$H_{5\%}$	GenAIEx 6.2
	Diversité haplotypique	Hs	GenAIEx 6.2
	Probabilité d'exclusion	EP	GenAIEx 6.2

Tableau II.6 : Les différents paramètres de diversité génétique calculés.

semis issus du processus de dispersion de 2007 a été réalisé en juin 2007. A chaque point d'un maillage de 25 x 25m (84 points au total), une zone de 4m² (2 x 2m) a été subdivisée en quatre quadrats de 1m² qui ont fait chacun l'objet d'un inventaire exhaustif des semis présents. En se basant sur l'hypothèse qu'à une échelle de 4m² il existe peu de variabilité de la pluie de graines, la variabilité du nombre de semis reflète la variabilité du processus de germination. Pour pouvoir expliquer cette variabilité, une notation de réceptivité du milieu pour chaque quadrat a été réalisée selon 3 classes : non réceptif (exemples : présence d'une souche, d'une ornière remplie d'eau), peu réceptif (exemples : présence d'un amas de branches, d'une litière épaisse et continue de feuilles de chênes, de touffes de jonc) et réceptif (absence d'obstacle identifié).

2. Analyse des données recueillies

2.1 Analyse des données moléculaires

2.1.1 Descripteurs de la diversité génétique

Afin de caractériser la diversité génétique présente dans les populations de reproducteurs , de graines ou de jeunes semis échantillonnées dans le site de Haguenau, plusieurs paramètres génétiques de base ont été calculés pour chacun des types de marqueurs moléculaires utilisés (chloroplastiques et nucléaires) (**Tableau II.6**). Dans le cas des marqueurs chloroplastiques, l'analyse de la diversité neutre a été réalisée sur les haplotypes seuls, qui ont été définis à l'aide d'un code R développé pour cette étude. Différents paramètres ont été calculés avec GenAlEx version 6.2 (Peakall et Smouse, 2006) : le nombre d'haplotype (Nh), le nombre d'haplotypes privés ou spécifiques à la population d'étude (Hp), le nombre d'haplotypes représentés par un seul individu (H1), le nombre d'haplotypes présentant une fréquence relative supérieure à 5% dans la population d'étude (H5%), la diversité haplotypique Hs et la probabilité d'exclusion EP.

Pour les marqueurs nucléaires, le nombre d'allèles par locus (A), le nombre efficace d'allèles par locus (Ae), le nombre d'allèles privés (Ap) et le nombre d'allèles de fréquence relative supérieure à 5% (A5%) ont également été calculés avec GenAlEx version 6.2 (Peakall et Smouse, 2006). Les valeurs d'hétérozygotie observée (Ho) et attendue (He) et le déficit en hétérozygotes (Fis) ont été calculées avec Fstat version 2.9.3 locus par locus et au niveau

multilocus (Goudet, 1995). Les probabilités d'exclusion (EP) ont été déterminées avec Cervus version 2.0 (Marshall et al., 1998).

2.1.2 Différentiation génétique des nuages polliniques

Sous l'hypothèse de flux de gènes limités dans l'espace, on s'attend à ce que la différentiation génétique augmente avec la distance (Wright, 1983). Des méthodes statistiques ont ainsi été développées pour prédire les capacités de dispersion du pollen à partir des estimations de différentiation entre les nuages polliniques captés par différents arbres mères (Smouse et al., 2001 ; Robledo –Arnuncio et al., 2007). Ces analyses de différenciation peuvent par ailleurs permettre de mettre en évidence les facteurs qui influencent la dispersion du pollen et le succès reproducteur mâle (Dyer et Sork, 2001).

Dans le vaste massif à forte dominance de pins sylvestres que constitue la zone de Haguenau, on peut émettre l'hypothèse de la présence d'un important nuage pollinique en période de floraison, résultat des contributions polliniques cumulées et plus ou moins intimement mélangées des reproducteurs présents dans les divers boisements de pins sylvestres sexuellement matures. Les dimensions d'un tel nuage excèderaient largement celles de chacune des unités de gestion forestières. Il nous a donc paru pertinent dans un premier temps de vérifier s'il existait réellement une différentiation entre les compositions génétiques des nuages polliniques captés par les arbres mères de notre zone d'étude (3 parcelles). Dans le cas d'une différentiation effective entre nuages polliniques, nous avons réalisé une analyse complémentaire de la diversité génétique de chacun d'entre eux et des niveaux d'apparentement intra nuage et entre nuages.

Estimer le niveau de différentiation des nuages polliniques captés par les différents arbres mères (approche TwoGener, Smouse et al., 2001) nécessite de connaître l'identité génétique des gamètes mâles qui sont à l'origine des graines étudiées. Une approche directe, à partir des marqueurs du génome chloroplastique, permet d'identifier le génotype du gamète mâle puisque l'haplotype de la graine reflète exactement l'haplotype du gamète mâle qui l'a engendrée. En revanche, les marqueurs nucléaires ne permettent pas d'accéder directement à cette information. L'analyse des descendances maternelles permet toutefois de déduire le génotype paternel par comparaison du génotype de la graine avec celui de la mère dont elle est issue. Le génotype du gamète mâle est donc reconstruit en soustrayant pour chaque locus le génotype de la mère au génotype de la graine (Smouse et al., 2001). Dans certains cas, le gamète mâle peut être retrouvé sans ambiguïté, mais lorsque la mère et son descendant sont

hétérozygotes pour les mêmes allèles, il s'avère impossible de distinguer les génotypes des gamètes maternel et paternel. Dans ce cas, le génotype du gamète mâle est reconstruit par maximum de vraisemblance en fonction des fréquences alléliques des marqueurs utilisés dans la population de graines (Smouse et al., 2001). Le jeu de données a ainsi été reconstruit pour chaque descendance maternelle.

Pour quantifier la différenciation des nuages polliniques (PhiFT), la population de gamètes paternels a été analysée selon une AMOVA (Excoffier et al. 1992). La distance entre les paires de profils polliniques a donc été calculée en utilisant d'une part les haplotypes des graines et d'autre part les génotypes des gamètes reconstruits à partir des données nucléaires. L'analyse de différenciation a été conduite à trois niveaux :

- (1) au niveau de l'arbre-mère, en regroupant les descendances par arbre ;
- (2) au niveau de la phénologie de floraison femelle, en regroupant les descendances selon la phénologie précoce ou tardive des arbres mères ;
- (3) au niveau de la parcelle, en regroupant les descendances selon le parcellaire.

La différenciation a été testée au niveau global puis au niveau spatial (cas 1 uniquement) afin de savoir s'il existait une structuration spatiale des nuages polliniques (approche identique à TwoGener (Smouse et al., 2001)) en fonction des groupes définis. L'AMOVA a par ailleurs permis d'obtenir les contributions relatives des variations génétiques intra- et inter-groupe. L'ensemble des analyses a été réalisé à l'aide du logiciel Genalex 6.2 (Peakall et Smouse, 2006). La significativité de la différenciation des nuages polliniques a été testée par 1000 permutations aléatoires.

2.1.3 Apparentement génétique des nuages polliniques

Avoir des nuages polliniques différenciés ne signifie pas forcément que ces nuages ne présentent pas un certain niveau d'apparentement entre gamètes mâles. En plus de tester la différenciation des nuages polliniques, il s'avère aussi important de calculer le niveau d'apparentement au sein de chaque descendance.

Principe d'analyse

La diversité du nuage pollinique capté par chaque arbre-mère a été caractérisée à l'aide d'un coefficient moyen d'apparentement F_s (Hardy et al., 2004) calculé sur les descendances maternelles. Les profils des gamètes mâles ont été reconstruits en comparant le génotype des graines et celui des mères. La seule différence par rapport à la méthode utilisée dans le

paragraphe précédent réside dans la reconstruction des profils des gamètes mâles dans les cas ambigus (voir Hardy et al., 2004 pour plus de détails). Le jeu de données a ainsi été reconstruit pour chaque descendance maternelle en considérant le gamète mâle homozygote dans les cas non ambigus, et hétérozygote dans les cas ambigus (Hardy et al., 2004). Pour chaque paire de gamètes paternels au sein d'un arbre-mère, le coefficient d'apparentement F_{ij} a ensuite été calculé selon l'équation suivante (Loiselle et al., 1995) :

$$F_{ij} = \frac{\sum_l \sum_a (p_{lai} - \bar{p}_{la})(p_{laj} - \bar{p}_{la})}{\sum_l \sum_a \bar{p}_{la}(1 - \bar{p}_{la})} + \frac{1}{2(n-1)}$$

où p_{lai} et p_{laj} sont les fréquences de l'allèle a, au locus l, pour les gamètes paternels i et j ; \bar{p}_{la} est la fréquence moyenne de l'allèle a, au locus l, et n indique le nombre total de gamètes pour l'ensemble des descendances maternelles.

Dans un premier temps, les valeurs de F_s ont été obtenues en calculant la moyenne des F_{ij} au sein d'un arbre mère (i.e. entre demi-frères) pour obtenir une valeur pour chaque arbre mère. $2F_s$ permet d'estimer la probabilité qu'une paire de gamètes à l'intérieur du nuage pollinique d'un arbre-mère possède le même père (Hardy et al., 2004). Par la suite, la moyenne des F_{ij} pour des descendants issus d'arbres-mère différents a été calculée en fonction de la distance séparant les arbres-mères. L'apparentement entre nuages polliniques peut ainsi être mesuré dans une perspective spatiale.

Analyses réalisées

Les analyses ont été réalisées à partir des données nucléaires et chloroplastiques. Pour les données nucléaires, les informations utilisées sont les allèles à chaque locus. Lorsque l'allèle mâle à un locus peut être reconstruit sans ambiguïté, $p_{lai} = 1$ si l'allèle paternel est l'allèle a, sinon $p_{lai} = 0$. Si le descendant et la mère ont le même génotype hétérozygote, la contribution paternelle ne peut être estimée sans ambiguïté, et dans ce cas : $p_{lai} = 0.5$ pour chacun des deux allèles possibles et $p_{lai} = 0$ pour les autres allèles. Pour les données chloroplastiques, il n'y a

pas d'ambiguïté dans le génotype du gamète paternel. L'analyse est donc réalisée en considérant un seul locus avec $p_{lai} = 1$ si l'haplotype paternel est l'haplotype a.

On s'attend à ce que $F_{ij} = 0.5$ si les gamètes i et j ont pour origine le même père, et $F_{ij} = 0$ si les gamètes ont pour origine des pères non apparentés. Pour chaque arbre-mère, F_s est ainsi inversement proportionnel au nombre efficace de pères N_{ep} , avec $N_{ep} = 1/2F_s$ qui est une mesure courante de la diversité du nuage pollinique. Pour vérifier l'existence d'une structuration de l'apparentement entre descendances en fonction de la distance, 10 000 permutations aléatoires des individus ont été réalisées. Celles-ci permettent de construire l'enveloppe d'absence de structuration spatiale de l'apparentement (intervalle de confiance à 95%). L'ensemble des analyses a été réalisé à l'aide du logiciel SPAGEDI (Hardy & Vekemans, 2002).

2.1.4 Caractérisation du régime de reproduction

Le régime de reproduction des plantes est une caractéristique biologique importante des espèces. C'est en effet un déterminant majeur de la diversité et de la structure génétique des populations, mais aussi de leur potentiel évolutif (Brown, 1990). Les plantes ont été classées selon les caractéristiques de leur régime de reproduction qui varie de l'autofécondation pure à l'allofécondation pure (Brown, 1990). Les conifères, espèces monoïques à pollinisation anémophile, sont généralement caractérisés par un régime de reproduction mixte, qui permet à la fois de l'autofécondation et de l'allofécondation (Mitton, 1992). Les taux d'autofécondation sont toutefois relativement faibles, la majorité des événements de pollinisation (>90%) ayant pour origine du pollen issu d'un individu différent de celui qui produit les graines (Mitton, 1992). Cette observation est cependant en contradiction avec la loi d'action de masse, qui prédit que le nombre d'événements de pollinisation par un père est fonction de la quantité de pollen de cet individu autour d'un arbre mère cible (Holsinger, 1995).

Nous avons donc étudié le régime de reproduction du pin sylvestre au sein de trois parcelles contigües présentant des densités locales de reproducteurs variables. Ces parcelles sont en outre situées au cœur d'un massif forestier de grande taille.

Analyses réalisées

Différents paramètres décrivant le régime de reproduction ont été estimés par maximum de vraisemblance sur la base d'un 'mixed mating model' intégré dans le logiciel MLTR version

3.1 (Ritland, 2004). Ce modèle repose sur les principales hypothèses suivantes : (1) chaque événement de fécondation est dû soit à de l'allofécondation (probabilité t) soit à de l'autofécondation (probabilité $s = 1-t$) ; (2) la probabilité d'allofécondation est indépendante du génotype maternel et (3) le nuage pollinique est homogène entre arbres-mères (Ritland et Jain, 1981). A partir des génotypes diploïdes des graines, peuvent être estimés le taux d'allofécondation multilocus (t_m), le taux d'allofécondation simple locus (t_s), le taux d'allofécondation entre arbres apparentés (t_m-t_s) et la proportion de plein-frères parmi les descendants issus d'allofécondation (correlated paternity, r_{pm})

Dans une première approche globale, le régime de reproduction a été analysé à partir des données nucléaires issues des graines ($n = 1041$) des 31 descendances récoltées. Un algorithme de type EM (Expectation-Minimization) a été utilisé pour les calculs de vraisemblance et 1000 procédures 'bootstrap' entre familles ont été réalisées pour calculer l'intervalle de confiance à 95% des paramètres. La population de référence utilisée pour l'estimation des paramètres est composée des adultes génotypés et des contributions polliniques inférées à partir d'une comparaison entre génotypes des graines et génotypes des mères. Les fréquences alléliques de cet ensemble constituent les fréquences alléliques de référence. La taille de voisinage, c'est à dire le nombre moyen de pères différents qui contribuent à chaque descendance, a été estimée par la formule : $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_{pm}$ (Ritland, 1989). Afin de savoir s'il existait une différence de régime de reproduction selon la densité de reproducteurs, le jeu de données a ensuite été divisé en fonction des parcelles forestières (trois densités moyennes différentes). Les paramètres ont été estimés pour chaque parcelle, ainsi que leur intervalle de confiance, en réalisant 1000 procédures 'bootstrap' entre parcelles. La comparaison des paramètres entre parcelles a été réalisée à l'aide d'un test de Student.

2.1.5 Analyses de paternité

Les analyses de paternité ont largement été utilisées pour décrire les flux de pollen chez les arbres forestiers (Bittencourt et Sebbenn, 2007 ; Lourmas et al., 2008 ; Robledo-Arnuncio et Gil, 2005 ; Dow et Ashle, 1998). Ces analyses se basent sur des récoltes de descendances maternelles échantillonnées sur différents individus puis génotypées à l'aide de marqueurs polymorphes (Burczyk et al., 2004). Les flux de pollen sont alors reconstruits en identifiant le père de chaque graine dans la zone d'échantillonnage. Les flux de gènes extérieurs peuvent

alors être estimés à partir de la proportion de graines qui ne possèdent aucun père compatible dans la zone (Streiff et al., 1999).

La première étape utilise seulement les données nucléaires et suit les méthodes d'assignation proposées par Marshall et al. (1998) et Gerber et al. (2003). Les résultats obtenus par ces méthodes sont ensuite analysés à l'aide des données chloroplastiques. L'utilisation des données chloroplastiques pour des assignations de paternité s'avère impossible pour le moment, étant donnée la difficulté à obtenir des fréquences haplotypiques fiables dans la population (voir partie suivante pour plus de détails).

Reconstitution de parenté à l'aide de données nucléaires

La reconstitution de filiation par recherche de paternité est basée sur deux principes complémentaires:

- **la capacité d'assignation** : la procédure d'assignation repose sur la comparaison du génotype de trois individus : l'arbre-mère, son descendant et un père potentiel. En comparant le génotype d'un arbre-mère et de son descendant, il est possible d'en déduire la contribution paternelle. Si le père génotypé est incompatible avec le couple mère-descendant, il est exclu de l'analyse. S'il est compatible, il est conservé. En réalisant cette démarche pour tous les pères, on peut donc aboutir à trois situations différentes :

- aucun père n'est compatible avec le descendant
- un seul père est compatible
- plusieurs pères sont compatibles.

La capacité d'assignation dépend fortement du jeu de marqueurs génétiques utilisés. Elle peut être synthétisée sous la forme d'une probabilité d'exclusion (EP, Jamieson et Taylor, 1997) qui détermine la capacité à rejeter un père qui n'est pas le bon. La combinaison de plusieurs loci permet d'augmenter considérablement cette probabilité.

- **la vraisemblance de paternité** : lorsque un seul père est considéré comme compatible, il est possible que celui-ci ne soit pas le vrai père étant donné la quantité potentielle de pères compatibles non génotypés (hors zone d'étude). De plus, lorsque plusieurs pères sont compatibles, il s'avère impossible de déterminer le vrai père. Pour pallier à ce problème, les lois de ségrégation mendéienne permettent de calculer la probabilité qu'un individu (i) soit le père d'un descendant. Cette probabilité est appelée la vraisemblance (likelihood) de paternité (Edwards 1972 ; Thompson, 1975). Le rapport de vraisemblance entre un individu (i) et un individu pris au hasard est appelé le likelihood ratio. En

Calcul des LOD scores

Le LOD score permet de mesurer la réalité de l'existence d'une relation de parenté R entre deux individus A et B . Il est calculé à partir du rapport des vraisemblances :

$$\text{LOD score} = \ln \left[\frac{p(\text{A et B liés par la relation R})}{p(\text{A et B non apparentés})} \right]$$

La valeur du LOD score dépend des génotypes A et B et des fréquences alléliques dans la population. Plus la valeur du LOD est élevée, plus la relation R a de chances d'être vraie.

Sous l'hypothèse de panmixie et qu'il n'y a pas de déséquilibre de liaison entre les loci, les LOD scores peuvent être calculés à partir du tableau suivant (d'après Marshall et al., 1998). Le tableau donne les différentes valeurs du LOD score (colonne 6), défini comme la probabilité d'observer le génotype d'un descendant en connaissant sa mère et son père (colonne 4), divisé par la probabilité d'observer le génotype du descendant en connaissant uniquement sa mère (colonne 5).

Descendant (g_0)	Père potentiel (g_a)	Mère (g_m)	$T(g_0 g_m, g_a)$	$T(g_0 g_m)$	LOD score
BB	BB	BB	1	b	$1/b$
BB	BX	BB	1/2	b	$1/2b$
BB	BB	BX	1/2	$b/2$	$1/b$
BB	BX	BX	1/4	$b/2$	$1/2b$
BC	BB	CC	1	b	$1/b$
BC	BX	CC	1/2	b	$1/2b$
BC	BB	CY	1/2	$b/2$	$1/b$
BC	BX	CY	1/4	$b/2$	$1/2b$
BC	BB	BC	1/2	$(b+c)/2$	$1/(b+c)$
BC	BY	BC	1/4	$(b+c)/2$	$1/2(b+c)$
BC	BC	BC	1/2	$(b+c)/2$	$1/(b+c)$

Procédure de calcul du paramètre Δ

Le principe de calcul repose sur la simulation de descendance.

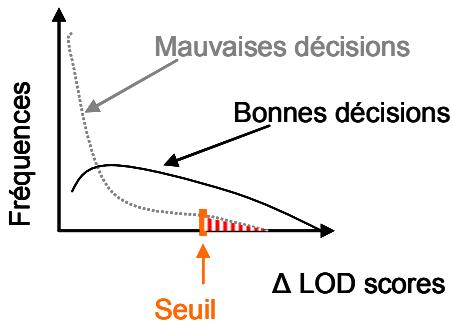
Etape 1: Génération aléatoire de 1000 descendants.

Les génotypes sont créés par union de deux gamètes tirés dans les génotypes des parents potentiels recréés à partir des fréquences alléliques de la population parentale.

Etape 2: Calcul des LOD scores et assignation pour chaque descendant du père au LOD score le plus élevé

Etape 3: Tri des bonnes et mauvaises décisions et calcul du paramètre Δ (différence pour un descendant entre les LOD score des deux pères les plus vraisemblables)

Etape 4: Estimation du seuil de Δ pour le risque choisi



La valeur de Δ (trait orange) supérieure à 95% de la courbe de distribution des mauvaises décisions (la zone hachuré rouge représente 5% des cas) est conservée comme valeur seuil. Cette valeur minimise la probabilité que le père retenu soit le mauvais.

L'assignation de paternité est attribué au père avec le LOD score le plus élevé si la différence avec le second père est supérieure à Δ .

Figure II.13 : Méthode de calcul des LOD scores et principe des analyses de parenté.

additionnant le logarithme de ce rapport (LOD score) pour tous les locus, on peut ainsi déterminer l'individu le plus probable (Meagher, 1986). Si le LOD score est nul, l'individu sélectionné (i) a la même probabilité d'être le père que n'importe quel individu pris au hasard. Le critère du LOD score le plus élevé présente des limites, notamment en raison du fait qu'il favorise les pères homozygotes, mais aussi en raison du flux de gènes caché (lorsque un individu est déterminé comme le vrai père alors qu'en réalité le vrai père fait partie des individus non génotypés). Pour résoudre ce problème, Marshall et al., (1998) proposent d'utiliser un paramètre Δ (delta), égal à la différence de LOD score entre les deux individus ayant la plus grande vraisemblance. La paternité est alors attribuée à l'individu ayant le LOD score le plus élevé seulement si Δ dépasse un certain seuil. La valeur seuil de delta, déterminée par simulation, permet de fixer le risque de fausse attribution au seuil voulu (5% par exemple, voir **Figure II.14.**)

Analyses réalisées

Les analyses de paternité ont été réalisées uniquement pour les 20 mères situées en situation d'échantillonnage exhaustif. L'analyse s'est déroulée en deux étapes. La première étape, qui utilise seulement les données nucléaires, suit les méthodes d'assignation proposées par Marshall et al. (1998) et Gerber et al. (2003) détaillées ci-dessus. Pour chaque graine, un père a été assigné par maximum de vraisemblance à l'aide du logiciel CERVUS 2.0 (Marshall et al., 1998). Pour chaque descendance, seuls les individus adultes compris dans la zone d'échantillonnage exhaustif autour de l'arbre mère ont été considérés comme pères potentiels. La paternité a été attribuée selon le critère Δ (Marshall et al., 1998). L'estimation de la valeur critique de Δ s'est faite à partir du logiciel CERVUS 2.0 en réalisant 10 000 simulations avec comme paramètres d'entrée un taux d'erreur de 0.01 et 417 individus comme pères potentiels (i.e la taille échantillonnée). Les valeurs de Δ ont été déterminées pour des seuils de confiance d'attribution de 95% ('strict') et 85% ('étendu').

La deuxième étape consiste à comparer l'haplotype des individus assignés par analyse de paternité (données nucléaires) à l'haplotype des graines. Deux situations peuvent alors se présenter : soit l'individu est compatible (haplotypes identiques) et il est alors considéré comme le père, soit l'individu est incompatible. Lorsque les deux haplotypes n'étaient pas identiques, une comparaison allèle par allèle a été réalisée et le nombre d'allèles différents a été comptabilisé.

Une analyse dans l'autre sens a aussi été réalisée, en attribuant d'abord des pères aux graines par exclusion simple sur les données haplotypiques (Robledo-Arnuncio et Gil, 2005). L'ensemble des pères compatibles au niveau haplotypique a ensuite été utilisé dans une analyse de paternité basée sur les loci nucléaires.

2.1.6 Analyses de maternité

Les études de maternité visent à retrouver à partir de semis et d'adultes génotypés, les relations mère-descendant. Chez les espèces forestières, les études de dispersion des gènes à partir d'individus en place (i.e semis) sont relativement rares (Gonzales-Martinez et al., 2002 ; Yazdani et al., 1989 ; Dow et Ashley, 1996). Utiliser des méthodes de reconstruction de parenté pour inférer la dispersion des semis est pourtant particulièrement intéressant dans le genre *Pinus* où la production de graines est généralement élevée et où une forte sélection est attendue dans les premiers stades de développement (Lanner, 1998).

Analyses réalisées

Le principe des analyses de maternité repose sur le même principe que celui des analyses de paternité. La seule différence réside en l'attribution à chaque descendant étudié d'un couple de parents compatibles au lieu de n'attribuer qu'un seul parent. Les paramètres et méthodes utilisées pour déterminer la valeur de Δ sont identiques à celles des analyses de paternité.

Pour chacun des semis des plots de régénération A, B et D, un couple de parents compatibles a donc été attribué pour des seuils de confiance d'attribution de 95% ('strict') et 85% ('étendu'). D'après les recommandations de Dow et Ashley (1996), deux hypothèses ont été faites : (1) si un seul individu est compatible avec le semis, celui-ci est considéré comme l'arbre mère ; et (2) lorsque un couple d'individus est compatible, c'est l'arbre le plus proche qui est considéré comme l'arbre mère, l'autre étant considéré comme le père.

2.2 Etude de la structuration spatiale de la diversité génétique (sites de Haguenau et Orléans)

2.2.1 Structuration spatiale de la diversité génétique neutre

Une structuration génétique spatiale (SGS) se définit comme une distribution non aléatoire des génotypes dans l'espace. Ainsi on s'attend, en cas d'isolement par la distance (flux de gènes limités), à ce que la ressemblance génétique des individus diminue avec la distance

(Wright, 1943). La structure génétique spatiale du peuplement reproducteur de Haguenau a été analysée à l'aide d'une analyse d'autocorrélation spatiale de l'apparentement génétique entre paires d'individus. Le coefficient d'apparentement de Loiselle et al., (1995) entre paires d'individus a été calculé à l'aide du logiciel SPAGEDI (Hardy & Vekemans, 2002) selon l'équation :

$$F_{ij} = \frac{\sum_{l=a}^l \sum_{a} (p_{lai} - \bar{p}_{la})(p_{laj} - \bar{p}_{la})}{\sum_{l} \sum_{a} \bar{p}_{la}(1 - \bar{p}_{la})} + \frac{1}{2(n-1)}$$

Etant donné que F_{ij} est fonction de la probabilité que deux gènes identiques soient identiques par descendance, l'influence de la mutation a été négligée et nous avons utilisé l'identité d'état pour estimer l'identité par descendance (Rousset, 1996). L'hypothèse d'isolement par la distance a ensuite été testée en réalisant une régression entre la matrice des coefficients d'apparentement et la matrice des distances géographiques séparant les individus. La présence ou l'absence d'isolement par la distance (la structure génétique spatiale) peut alors être testée en calculant la pente de la régression (b_0) (Vekemans & Hardy, 2004). Une pente négative significative reflète l'existence d'une diminution de l'apparentement avec la distance, synonyme de structuration génétique spatiale. La représentation graphique de la structure spatiale a ensuite été réalisée en calculant la valeur moyenne du coefficient d'apparentement pour des classes de distances de 30m. Un corrélogramme est ainsi obtenu en regardant l'évolution du coefficient d'apparentement moyen en fonction de la distance.

Pour tester la significativité de la pente et des coefficients d'apparentement moyens, 10 000 permutations aléatoires des individus ont été réalisées. Les procédures énoncées ci-dessus ont été réalisées à la fois pour les données nucléaires et les données chloroplastiques.

2.2.2 Structuration spatiale de données phénotypiques

Pour des données à variation continue, il est possible de tester l'existence d'une structuration spatiale à l'aide d'une mesure d'autocorrélation spatiale. En présence d'autocorrélation spatiale, les statistiques classiques sont souvent inadaptées en raison de l'absence d'indépendance entre points (Cliff et Ord, 1981). Les tests de Mantel (Mantel, 1967) constituent une alternative pour caractériser les patrons spatiaux et identifier le type et l'intensité de la relation entre deux variables structurées spatialement. La valeur du coefficient de Mantel (r), dont la valeur varie de -1 à +1, estime l'intensité de la relation entre deux variables à partir des matrices de distance (ou dissimilarité) calculées pour chaque paire de points au sein de chacune des variables. A la différence du test de Pearson, une valeur

supérieure à zéro n'implique pas une relation positive entre les deux variables, mais indique qu'une forte (resp. faible) dissemblance entre deux points pour une variable se traduit par une forte (resp. faible) différence pour l'autre variable. A l'inverse, un coefficient négatif implique qu'une faible dissemblance entre points pour une variable se traduit par une forte différence pour l'autre variable. Lorsque l'une des deux variables est la distance géographique séparant les points, le coefficient de Mantel mesure alors l'autocorrélation spatiale. Une valeur positive signifie donc que deux points géographiques proches sont plus semblables que deux points éloignés pour la variable étudiée.

Il se peut cependant que deux variables soient corrélées uniquement en raison de leur liaison à une troisième variable commune, comme par exemple la position dans l'espace (cas d'autocorrélation spatiale). Dans ce cas, le test partiel de Mantel permet de s'affranchir de l'effet de cette troisième variable en travaillant à partir des matrices des résidus de la relation linéaire entre ces variables et la troisième (Smouse et al., 1986). Une corrélation statistique peut ainsi être calculée entre les deux variables tout en prenant en compte l'effet de la troisième. Pour tous les tests réalisés, la significativité du coefficient de Mantel (partiel et non partiel) a été testée en réalisant 10 000 permutations aléatoires des individus dans l'espace.

Lorsque un test de Mantel est appliqué entre les différentes valeurs prises par une variable en différents points de l'espace et la position géographique de ces points, le rm de Mantel indique le degré général d'autocorrélation spatiale. L'autocorrélation spatiale peut aussi être calculée pour différentes classes de distance, permettant ainsi de décrire le patron de structure spatiale (gradient, patch,...) ainsi que son échelle, à l'aide d'un corrélogramme qui représente la valeur de r en fonction de la distance géographique (Sokal, 1979). Un corrélogramme avec des valeurs positives dans les classes de faibles distances et des valeurs non significatives dans les autres classes, suggère un patron de type patch. A l'inverse, des valeurs positives dans les petites distances, diminuant progressivement en valeurs négatives dans la forte distance, suggère un patron spatial de type gradient (Legendre et Legendre, 1989). L'analyse précise de la structuration spatiale d'une variable nécessite donc à la fois de quantifier la valeur de la corrélation mais aussi de décrire sa structure à l'aide d'un corrélogramme.

L'existence d'une structuration spatiale a été testée à l'aide de test de Mantel pour les variables suivantes :

- les variables de floraison et de fructification des arbres adultes, en utilisant les notations individuelles d'abondance et de phénologie de floraison. Un test a été réalisé pour chaque variable et pour chaque site d'étude (phénologie et abondance de floraison à Haguenau, abondance de fructification à Orléans).

- les caractéristiques de voisinage des pièges à graines et de la pluie de graines sur le site d'Orléans. Des corrélogrammes (Oden et Sokal, 1986) illustrent le patron spatial observé à partir de classes de distances définies pour avoir des effectifs équilibrés. Des tests partiels de Mantel ont également été réalisés afin de déterminer quelle part de structuration spatiale de la pluie de graines pouvait être expliquée par la structuration spatiale des caractéristiques de voisinage des pièges.
- les effectifs de semis 2007 dénombrés à Orléans. Afin de prendre en compte l'hétérogénéité spatiale au sein d'un plot, 1000 jeux de données ont été reconstruits en tirant aléatoirement une sous-parcelle parmi les 4 mesurées à chaque nœud de la grille 25 x 25m. Nous avons conclu à l'existence d'une structuration spatiale du nombre de semis par m² si plus de 95% des jeux de données reconstruits montraient une structuration spatiale significative au seuil $\alpha = 0,05$.

Chapitre III

Caractérisation du peuplement reproducteur: capacités reproductrices, diversité génétique et structuration spatiale



L. Leveque

A- Site de Haguenau

Objectifs	Matériel végétal	Outils	Ref. chapitre II
Evaluation des capacités reproductrices et de leur variabilité individuelle et annuelle	Unité de gestion 59 arbres adultes 36 Descendances maternelles	Notation des floraisons mâle et femelle 2004-2006 Notation des fructifications 2002-2006 Rendement en graines pleines 2004-2005	II.1.1.4.1
Evaluation de la diversité génétique de l'unité de reproduction	Unité de gestion 459 arbres adultes Voisinage reproducteur 36 +116	Génotypage à l'aide de 4 microsatellites nucléaires et 6 microsatellites chloroplastiques	II.1.4.2 II.2.1.1
Structuration spatiale	Unité de gestion - Zones exhaustives - Echantillons complémentaires	Géoréférencement Estimation de la densité locale de reproducteurs	II.2.1 II.2.2

B- Site d'Orléans

Objectifs	Matériel végétal	Outils	Ref. chapitre II
Evaluation des capacités reproductrices et de leur variabilité individuelle et annuelle	Unité de gestion 170 arbres adultes 40 Descendances maternelles	Notation des fructifications 2007-2008 Rendement en graines pleines 2007-2008	II.1.2.3
Structuration spatiale	Unité de gestion Exhaustif 234 arbres adultes	Géoréférencement Estimation de la densité locale de reproducteurs	II.1.2.3 II.1.2.5 II.2.1 II.2.2

Tableau III.1 : Récapitulatif du matériel végétal et méthodes utilisées dans le chapitre III de la thèse. Pour plus de détails, se référer au chapitre II dans la partie indiquée dans la dernière colonne. (A) Site de Haguenau ; (B) Site d'Orléans-Ingrannes.

Chapitre III :Caractérisation du peuplement reproducteur : capacités reproductrices, diversité génétique et structuration spatiale

Le peuplement adulte reproducteur est à la base de l'ensemble des processus de dynamique forestière : reproduction, dispersion et installation des individus juvéniles (survie, croissance). Composition et distribution spatiale de la régénération, résultant de l'action de l'ensemble de ces processus sont donc dépendantes de la composition et de la distribution spatiale des reproducteurs impliqués. Caractériser l'unité de reproduction incluant l'unité de gestion en cours de régénération mais aussi le voisinage reproducteur est ainsi une étape importante permettant de préparer et prédire le devenir des populations d'arbres forestiers. C'est en effet cette unité de reproduction, à la base du processus de régénération, que le forestier façonne continuellement jusqu'à la phase de renouvellement. Ce sont les caractéristiques de cette dernière qui déterminent en grande partie les flux de gènes (pollen et graines) et qui permettent d'évaluer la qualité de prédition des modèles de génétique des populations utilisés pour suivre l'évolution de la diversité génétique.

Il nous a donc paru important, de faire précéder l'analyser des flux de pollen et de graines par une caractérisation des unités de reproduction associées à nos deux sites d'étude : Haguenau et Orléans. Si l'effort principal a porté sur l'unité de gestion mise en régénération, nous avons également essayé de décrire le voisinage reproducteur de ces unités de gestion. A l'aide de différents descripteurs phénotypiques (géoréférencement, mesures) et génétiques (marqueurs moléculaires) nous nous sommes intéressés :

- aux capacités reproductrices des unités de reproduction, en évaluant non seulement les performances moyennes mais en analysant leur variabilité au niveau arbre pour une même année et pour différentes années. Les caractérisations ont porté à la fois sur les floraisons mâle et femelle et sur la production de graines ;
- au niveau de la diversité génétique neutre disponible dans la population de reproducteurs potentiels en essayant de séparer semenciers et pollinisateurs
- à la structuration spatiale de ces descripteurs phénotypiques et génétiques au sein de l'unité de gestion.

L'analyse des flux de pollen et graines au sein des événements de régénération naturelle observés devrait permettre d'identifier parmi ces descripteurs de l'unité de reproduction des outils d'aide à la décision à présenter aux gestionnaires.

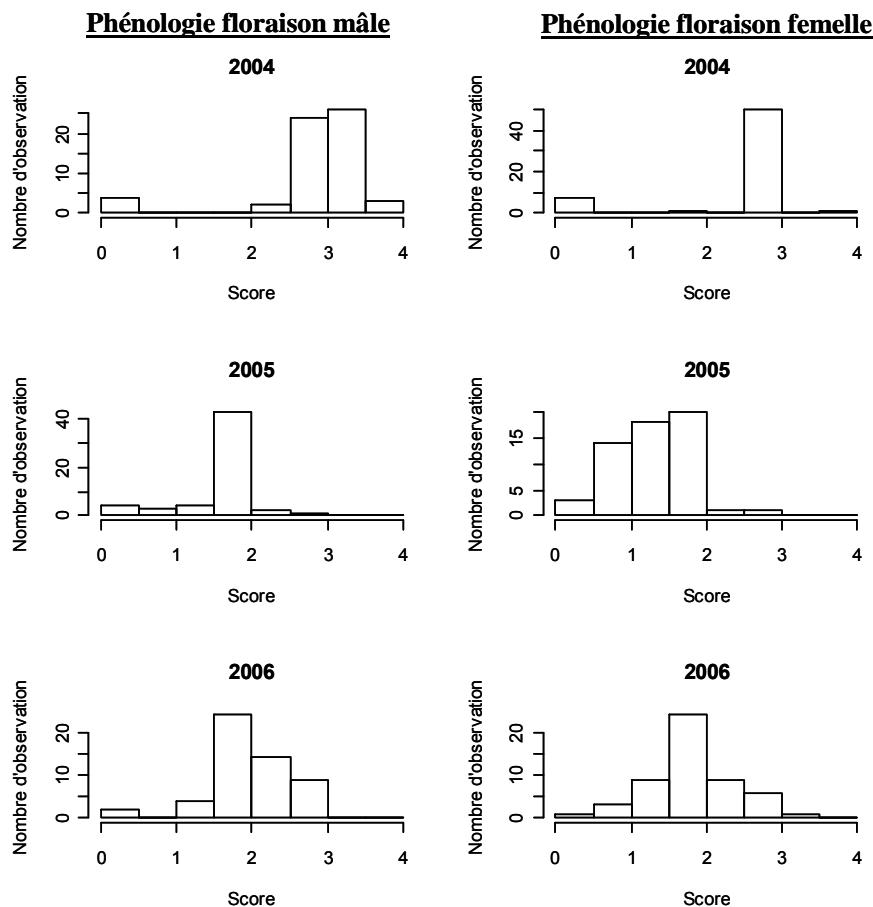


Figure III.1 : Histogrammes de distribution des phénologies florales mâle et femelle observées en 2004, 2005 et 2006 sur le site de Haguenau. Au total 59 arbres ont été observés pendant ces trois années. Les valeurs les plus faibles correspondent aux arbres les plus tardifs et les valeurs élevées aux arbres les plus précoce. Les stades 3 des floraisons mâle et femelle correspondent respectivement à l'émission de pollen et à la réceptivité des fleurs femelles. Dates de mesures : (2004) 17-18 Mai ; (2005) 10-11 Mai ; (2006) 15-16 Mai.

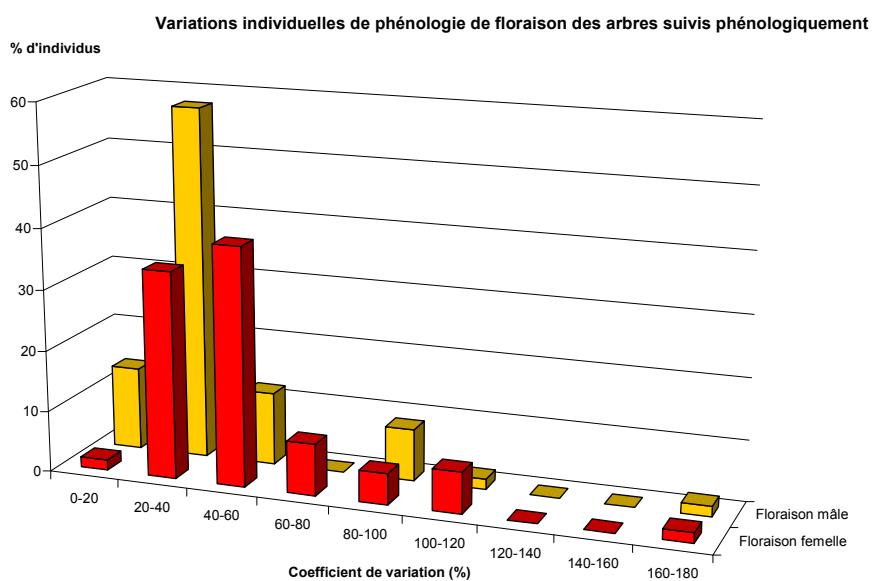


Figure III.2 : Histogrammes de distribution des coefficients de variation interannuelle des phénologies de floraison mâle et femelle sur le site de Haguenau. Les coefficients de variation ont été calculés sur trois années pour 59 arbres adultes.

1. Rappel des matériels et méthodes utilisées

Les caractéristiques des sites d'étude, des outils et méthodes utilisées sont détaillées dans le chapitre II. Le **tableau III.1** fournit un récapitulatif des matériels évalués, des descripteurs utilisés et des objectifs particuliers assignés à certaines parties d'expériences.

La plus grande partie des efforts de caractérisation concerne le site situé au sein du massif de Haguenau. C'est dans ce dernier que nous avons voulu associer description phénotypique et analyse de la diversité génétique à l'aide de marqueurs moléculaires.

Sur le site de la forêt d'Orléans, nous nous sommes limités à une caractérisation phénotypique en nous attachant à décrire de manière plus fine la variabilité des capacités reproductrices (floraison et fructification) et sa structuration spatiale. Etant donné le caractère relativement isolé de ce peuplement et la densité variable de pins sylvestres, il nous paraissait important d'identifier les composantes de productions de pollen ou/et de graines limitantes.

Enfin, les résultats acquis sur les deux sites ont été confrontés à ceux obtenus dans différentes études complémentaires réalisées par l'INRA et le CGAF et à ceux reportés dans la littérature.

2. Variabilité des capacités reproductrices

2.1 Phénologie de la floraison : variabilités individuelle et inter-annuelle

Les mesures de phénologie de floraison mâle et femelle réalisées sur le site de Haguenau de 2004 à 2006 montrent d'une part un bon regroupement des floraisons mâle ou femelle une année donnée, et d'autre part un bon synchronisme des floraisons mâles et femelles pour toutes les années (**Figure III.1**). En comparant la forme des histogrammes de distribution des floraisons mâle et femelle, il semble toutefois que pour les trois années, l'émission de pollen (stade 3) précède très légèrement la période de pleine réceptivité des fleurs femelles.

Il est à noter que chez le pin sylvestre l'évènement floraison est un évènement très fugace. En effet pour les trois années étudiées, plus de la moitié des arbres étudiés présentait un stade de précocité égal à 0 lors d'un passage en observation antérieur de 4 à 5 jours. Ce phénomène est également observé en parc à clones sur des arbres plus jeunes où les campagnes de croisements contrôlés qui couvrent la période de floraison sont réalisées sur moins de deux semaines.

Les différences annuelles observées sont plus à mettre en relation avec les dates d'observation qu'avec un véritable effet climatique sur la date moyenne de floraison. Les observations

a)

	PFF05	PFF06
PFF04	0,29 (n.s)	0,125 (n.s)
PFF05	-	0,436 ***
	PFM05	PFM06
PFM04	0,225 (n.s)	0,099 (n.s)
PFM05	-	0,409 **

b)

	AFF05	AFF06
AFF04	0,004 (n.s)	0,065 (n.s)
AFF05	-	0,368 **
	AFM05	AFM06
AFM04	0,458 ***	0,654 ***
AFM05	-	0,446 ***

Table III.2 : Coefficients de corrélation de Spearman inter annuels pour la précocité (a) et l'abondance (b) de floraison mâle (PFM) et femelle (PFF) sur le site de Haguenau. Les chiffres 04, 05 et 06 font référence aux années d'observation.

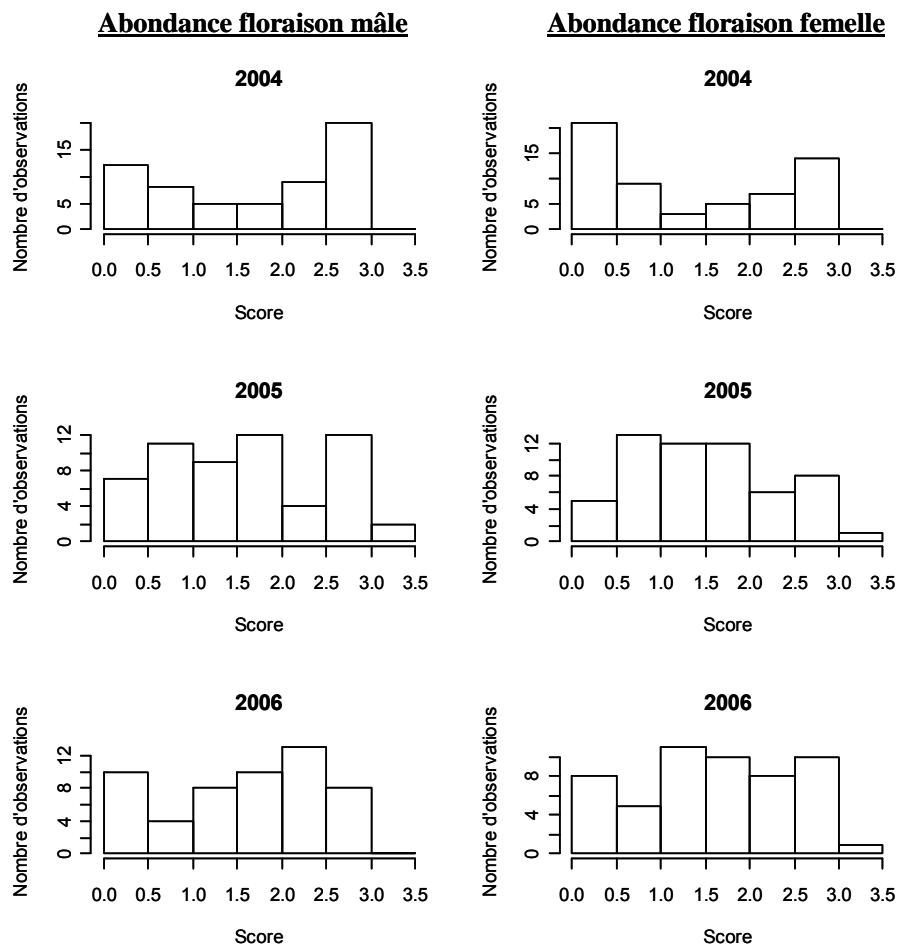


Figure III.3 : Histogrammes de distribution pour les notations d'abondance de floraison mâle et femelle réalisées en 2004, 2005 et 2006 sur le site de Haguenau. Au total 59 arbres ont été observés pendant trois années.

semblent en effet avoir été réalisées légèrement plus tardivement en 2004 à la fois d'un point de vue calendaire et du point de vue de l'état d'avancement des floraisons. De même, les observations ont peut-être été réalisées légèrement trop tôt en 2005 puisque la majorité des arbres n'émettent pas encore de pollen et n'ont pas atteint le stade de réceptivité. Ce suivi temporel montre tout de même une certaine stabilité inter annuelle dans la période de reproduction du pin sylvestre sur le site d'Haguenau, celle-ci ayant lieu aux alentours du 15 Mai.

Nous avons évalué la variabilité interannuelle de chaque arbre pour les phénologies de floraison à l'aide d'un coefficient de variation (CV) (**Figure III.2**). Pour les deux floraisons mâle ou femelle, on observe une variation interannuelle relativement faible des niveaux de précocité observés. Comme on pouvait s'y attendre par le calage différent des observations pour les trois années étudiées, la conservation du classement des individus n'est validée qu'entre les années 2005 et 2006 qui présentent des histogrammes de distribution comparables et centrés sur des valeurs moyennes assez proches (**Tableau III.2**). Le passage tardif de 2004 ne permet plus une discrimination suffisante entre individus pour confirmer une stabilité des classements.

2.2 Floribondités mâle et femelle : variabilités individuelle et inter-annuelle

Les notations de floribondités mâle et femelle réalisées sur le site de Haguenau de 2004 à 2006 soulignent le faible niveau de floraison de ces peuplements âgés avec des niveaux moyens observés bien inférieurs à la note 2 qui correspond à une niveau de bonne floraison (**Figure III.3**). Les productions de fleurs mâles et femelles sont également souvent inégalement réparties dans les houppiers et peuvent être très dispersées dans certains cas. Il est à noter une variabilité individuelle importante pour les deux types de floraison avec des distributions quasi-uniforme sur l'échelle de notation définie. La variabilité individuelle observée pour les floribondités mâle et femelle apparaît supérieure à celle observation pour la phénologie de floraison. Son niveau semble en outre relativement constant d'une année à l'autre. Au niveau populationnel, l'année 2004 apparaît être une moins bonne année de floraison que les années 2005 et 2006. Cette différence est relativement marquée pour la floraison femelle, avec de nombreux individus non florifères et un creux dans les classes intermédiaires. Une bonne stabilité interannuelle des classements de floribondités mâle et surtout femelle est observée (**Tableau III.2**). Le faible niveau de floraison femelle observé en 2004 ne permet pas une discrimination suffisante des individus nécessaire à une évaluation de

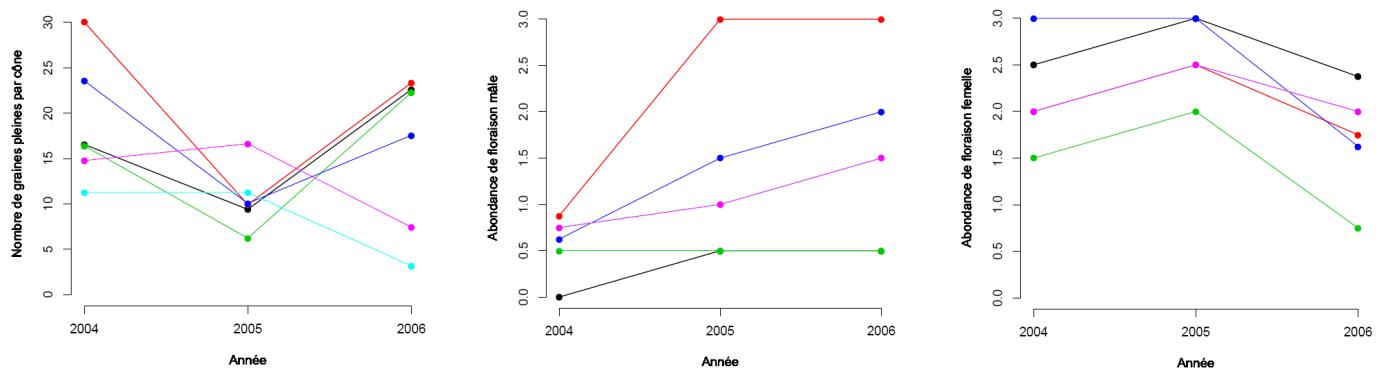


Figure III.4 : Variation interannuelle de la production de graines et des floribondités mâle et femelle pour 6 individus échantillonnés sur le site de Haguenau et présents sous forme de copies greffées à l'INRA d'Orléans. Les notations ont été faites à sur 3 copies par individu avec la même échelle de notation que celle utilisée à Haguenau. Chaque couleur représente un

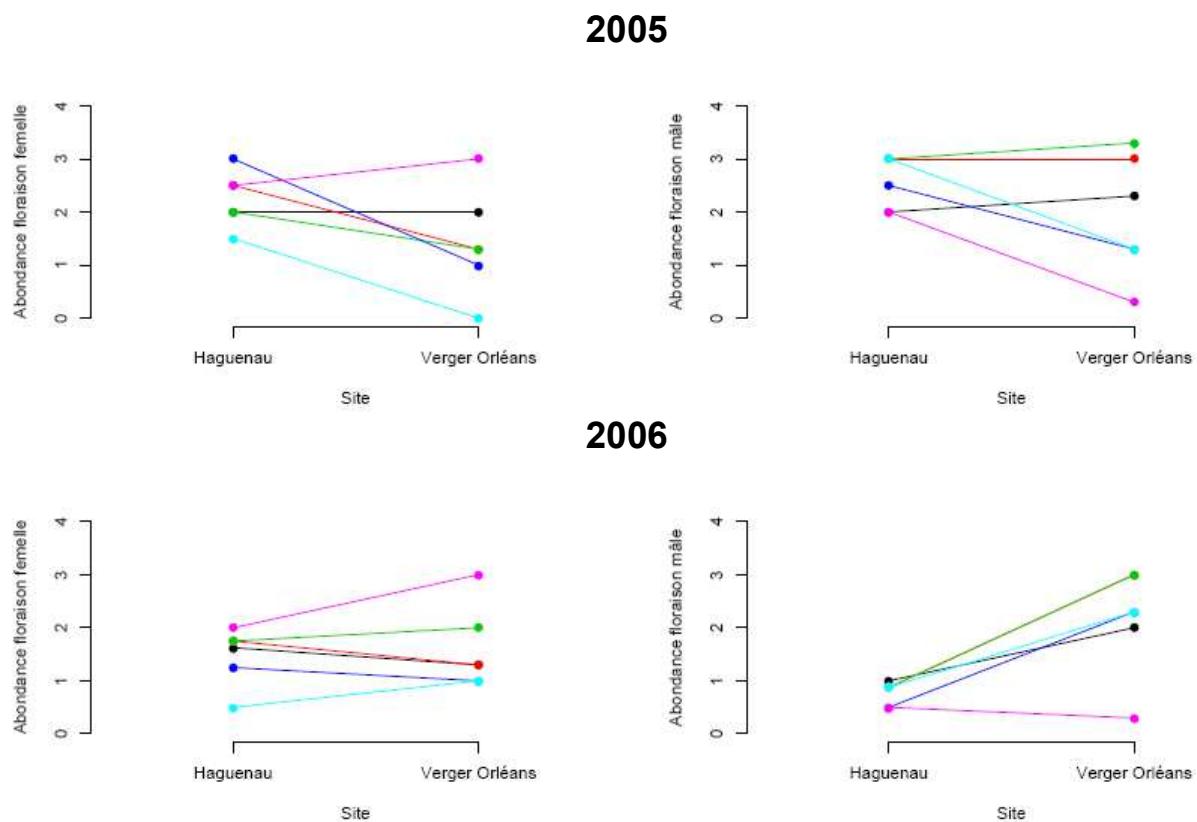


Figure III.5 : Variation intersite des floribondités mâle et femelle pour 6 individus échantillonnés sur le site de Haguenau et présents sous forme de copies greffées à l'INRA d'Orléans. Les observations ont été réalisées en 2005 et 2006 sur les deux sites. Chaque couleur représente un individu.

la stabilité des classements. Par contre, la relative stabilité temporelle des classements pour la floribondité mâle met en évidence l'existence d'individus 'bon producteurs' et 'mauvais producteurs' de pollen.

Des données complémentaires, issues d'observations réalisées sur des copies greffées de six individus échantillonnés dans ces mêmes trois parcelles, montrent dans un autre site (celui d'Orléans) la forte stabilité temporelle des caractéristiques de floraison de ces individus (**Figure III.4**). Il est à noter que l'expression de la variabilité individuelle est maximale lors des années de bonnes floraisons. Une comparaison des classements inter-site pour ces mêmes six individus commun met en évidence que le classement des individus est globalement respecté pour les deux types de floraison (**Figure III.5**). Par ailleurs, le site d'Orléans où les arbres ne sont pas en compétition permet une meilleure expression de la variabilité entre individus.

2.3 Fructification et capacité de production de graines

L'aptitude à produire des graines est une composante essentielle du succès reproducteur femelle. Cette aptitude peut être appréciée indirectement sur arbre en place par la production de cônes mais se doit d'être complétée par une analyse du rendement en graines à partir de récolte de cônes par tir au fusil. Pour caractériser ce rendement en graines, nous avons retenu les paramètres suivants :

- (1) le nombre moyen de graines pleines par cône qui est significativement corrélé aux dimensions du cône à taux de graines pleines constants (**Figure III.6**) ;
- (2) le taux de graines pleines qui permet d'accéder à une estimation du rendement efficace en graines ;
- (3) et le poids de 1000 graines, qui témoigne des capacités de réserve des graines et représente donc un critère de qualité physiologique des graines viables.

Nous n'avons pas retenu le pourcentage de germination dans cette présentation car les semis en conditions contrôlées réalisés avec les différents lots de graines récoltés en forêt de Haguenau montrent un taux de germination très élevé (>90%) et très peu variable entre descendances maternelles.

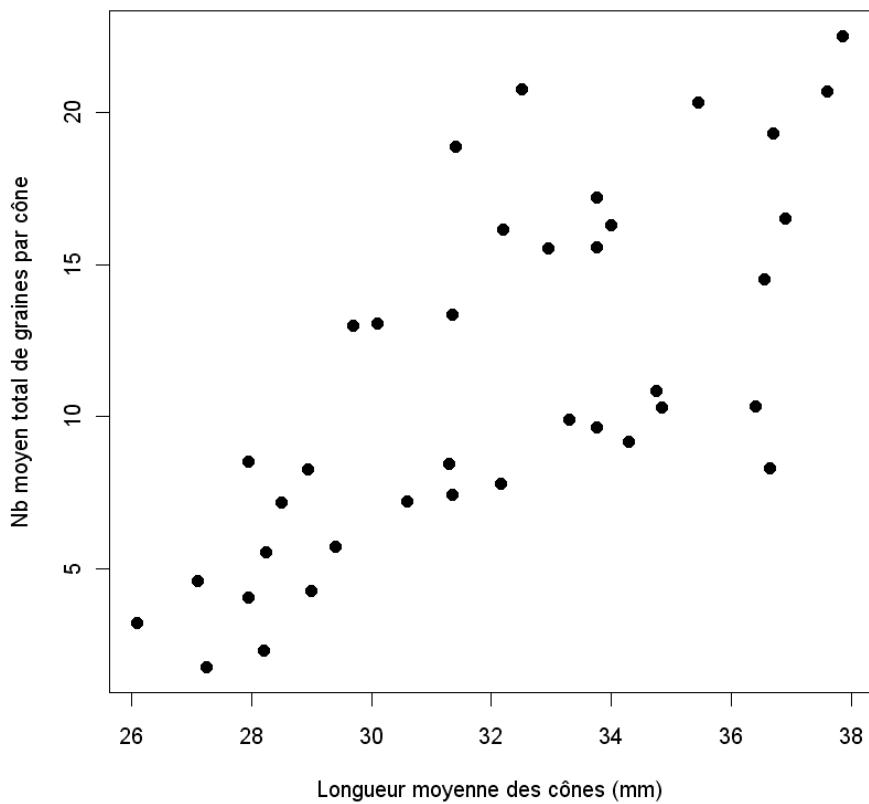


Figure III.6 : Relation entre la longueur moyenne des cônes et le nombre total de graines par cône (graines vides + graines pleines) dans les 36 descendances maternelles récoltées à Haguenau en 2004.

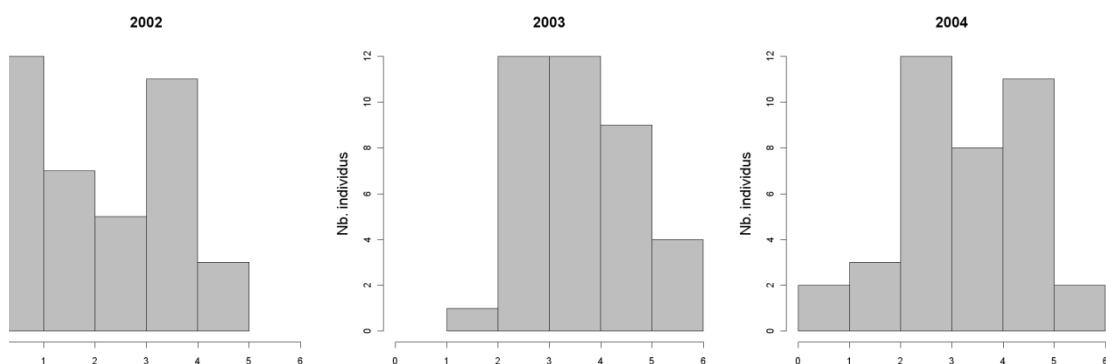


Figure III.7 : Histogrammes de distribution des notations de fructification (échelle de 0 à 5) réalisées sur les 38 arbres-mères du site de Haguenau entre 2002 et 2004. 36 de ces 38 arbres ont fait l'objet de récolte de descendances maternelles en 2004. Les histogrammes de distribution observés pour les années 2005 et 2006 sont comparables à l'histogramme observé en 2004.

Variabilité observée à Haguenau pour la fructification et la production de graines

La production de cônes a été estimée pour les années 2002 à 2006 sur un échantillon de 38 arbres-mères du peuplement incluant les 36 arbres ayant fait l'objet d'une récolte de descendances maternelles en 2004. Il est à noter que cet échantillon surestime probablement le niveau moyen de production du peuplement car un grand nombre d'arbres non fructifères n'ont pas été inclus dans l'échantillonnage initial. Les notations effectuées mettent essentiellement en évidence d'importants effets annuels sur la production de cônes avec en 2003 une production de cônes plus élevée qui a probablement conduit à la mise en place de la régénération naturelle qui fait l'objet de cette étude (**Figure III.7**). A l'inverse, l'année 2002 apparaît comme une mauvaise année de production de cônes. Les autres années présentent des histogrammes de distribution similaires à celui observé en 2004. Une relative stabilité des classements individuels est observée entre années ($r_{spearman}=0.34^* - 0.41^*$).

Une forte variabilité individuelle du rendement en graines peut être observée pour plusieurs composantes de ce rendement (**Figure III.8** ; **Tableau III.3**). Avec une moyenne de 6,2 graines pleines par cône sur l'ensemble des descendances et une distribution dissymétrique vers les plus faibles valeurs, le rendement en graines pleines observé dans ce peuplement peut être considéré comme faible pour une année de production de cônes représentative de la moyenne observée sur plusieurs années. Une très grande variabilité du taux de graines pleines est mise en évidence avec une distribution symétrique et gaussienne autour d'une valeur moyenne de 55%. La distribution observée pour le poids de 1000 graines souligne l'existence d'un grand nombre de valeurs faibles (inférieures à 5500 mg) et témoigne d'une limitation physiologique dans la maturation des graines chez ces arbres très âgés.

2.3.1 Variabilité observée en forêt d'Orléans pour la fructification et la production de graines

Sur le site de la forêt d'Orléans, la production individuelle de cônes a été évaluée pour les deux années successives 2007 et 2008. Comme déjà observé à Haguenau, il existe au niveau populationnel une forte variabilité inter-annuelle de la production de cônes (**Figure III.9 A**). Il est à noter que le classement des individus est globalement conservé d'une année à l'autre, les individus les plus fructifères en 2007 étant généralement aussi les plus fructifères en 2008 ($r_{spearman}=0.35^{***}$, **Figure III.9 B**).

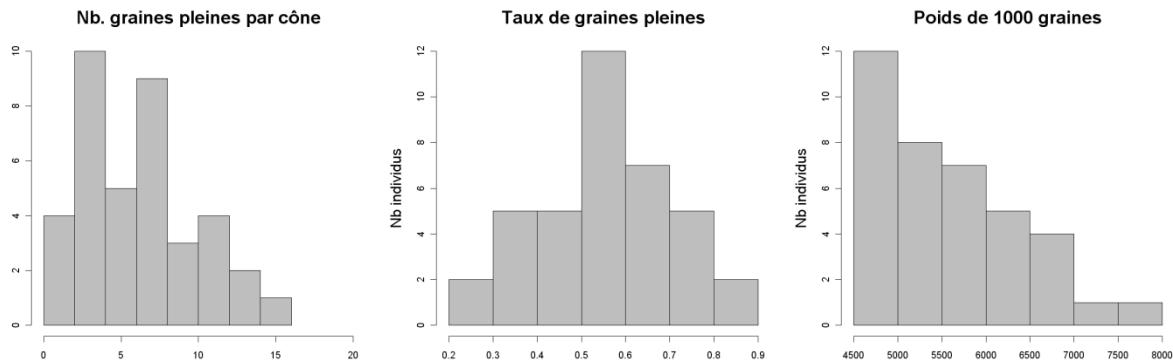


Figure III.8 : Composantes du rendement en graines observées dans 36 descendances maternelles récoltées en 2004 sur le site de Haguenau. Les estimations ont été réalisées sur 16 à 121 cônes par descendance.

	Site	Type de peuplement	Environnement	Nb descendances	Nb. graines pleines par cône	Taux de graines pleines	Poids de 1000 graines (mg)
Ft Haguenau	Récolte 2004	Futaie pure	Grandes zones de pin sylvestre	36	6,2 [1,0 – 15,1]	55% [21,8 – 81,8]	5648 [4510 – 7720]
	Récolte 2005			10	7,1 [3,1 – 13,3]	48% [19,0 – 77,3]	6015 [3690 – 7160]
Ft Orléans p951	Récolte 2007	Mélange chêne-pin en bouquets	Peuplement isolé dans un massif composé de chênaies	37	11,6 [3,6 – 21,0]	57% [12 – 75]	6260 4290 – 8510
	Récolte 2008			35	8,3 [1,1 – 16,6]	47% [22 – 62]	5930 [4810-8320]
Orléans INRA	Récolte 2006	Parc à clones Haguenau	Copies greffées d'arbres adultes plantées à large densité- Arbres âgés de 15 ans	19	14,5 [3,1 – 23,7]	67,9% [38,7 – 85,5]	8053 [6010 – 11110]
Ft Orléan p746	Récolte 2008	Mélange chêne-pin proche du pied à pied	Peuplement relativement isolé dans massif avec larges zones de pin sylvestre	33	12,6 [4,0 – 24,3]	59% [37 – 81]	-

Tableau III.3 : Comparaison de rendements en graines dans différents peuplements de pin sylvestre. Les trois composantes mesurées sont le nombre moyen de graines pleines par cône, le taux de graines pleines et le poids de 1000 graines. Les valeurs en gras représentent les valeurs moyennes sur l'ensemble des descendances analysées ; les valeurs entre crochets correspondent aux valeurs minimales et maximales. -, non disponible

Le rendement moyen en graines bien que fortement variable entre individus se révèle globalement plus élevé à Orléans qu'à Haguenau (**Figure III.10, Tableau III.3**). Les différences entre sites sont surtout marquées pour 2007, année de meilleure fructification à Orléans, et pour les deux composantes nombre moyen de graines pleines par cône et poids de 1000 graines. Le nombre de graines pleines par cône légèrement supérieur en moyenne présente une grande majorité d'individus à valeurs modérées et faibles, et quelques rares individus à valeurs élevées. Le poids de 1000 graines, significativement plus élevé qu'à Haguenau, montre une distribution plus régulière et symétrique. Ce résultat s'explique probablement par l'âge moyen des reproducteurs et un meilleur état physiologique à Orléans. Le classement des individus de la forêt d'Orléans reste conservé d'une année sur l'autre, aussi bien pour le taux de graines pleines ($r_{spearman}=0.36^{**}$) que pour le nombre de graines pleines par cône ($r_{spearman}=0.44^{***}$). Il confirme là encore l'existence de forts effets individuels, probablement de nature génétique pour différentes composantes du succès reproducteur.

2.4 Discussion : variabilité pour les capacités reproductrices

L'analyse des caractéristiques de floraison (phénologie et abondance) et de fructification (cône et graines) conduites plusieurs années sur les sites d'Orléans et de Haguenau nous a permis de montrer qu'il existait une forte variabilité individuelle et inter-annuelle pour ces traits de reproduction.

La forte variabilité inter-annuelle des floribondités mâles et femelles est un phénomène bien connu chez le pin sylvestre et d'autres espèces de conifères (Bila, 2000; Schoen et al., 1985). Les déterminants de l'alternance des années de bonnes et de mauvaises floraisons, restent cependant relativement méconnus (Lanner, 1998). Dans les études conduites en peuplement forestier et en vergers à graines, des variations inter-annuelles de floribondité mâle sont plus souvent reportées (Kang et al., 2001 ; Krouchi et al., 2004) que des variations de floribondité femelle (Bila, 2000). Les variations de fertilité mâle sont expliquées par un effet plus ou moins favorables des conditions climatiques lors de l'initiation florale en Juillet et par un effet plus marqué de l'âge des arbres en vergers à graines. Sur les deux sites étudiés, les variations les plus marquées concernent plutôt la floribondité femelle qui semble particulièrement faible chez les très vieux arbres du peuplement de Haguenau. Cette variabilité inter-annuelle pour la production de fleurs femelles est très certainement à l'origine de l'importante variabilité entre années également notée par plusieurs auteurs pour la production de cônes et de graines (Sarvas, 1962 ; Karlsson and Örlander, 2000; Hilli et al.,

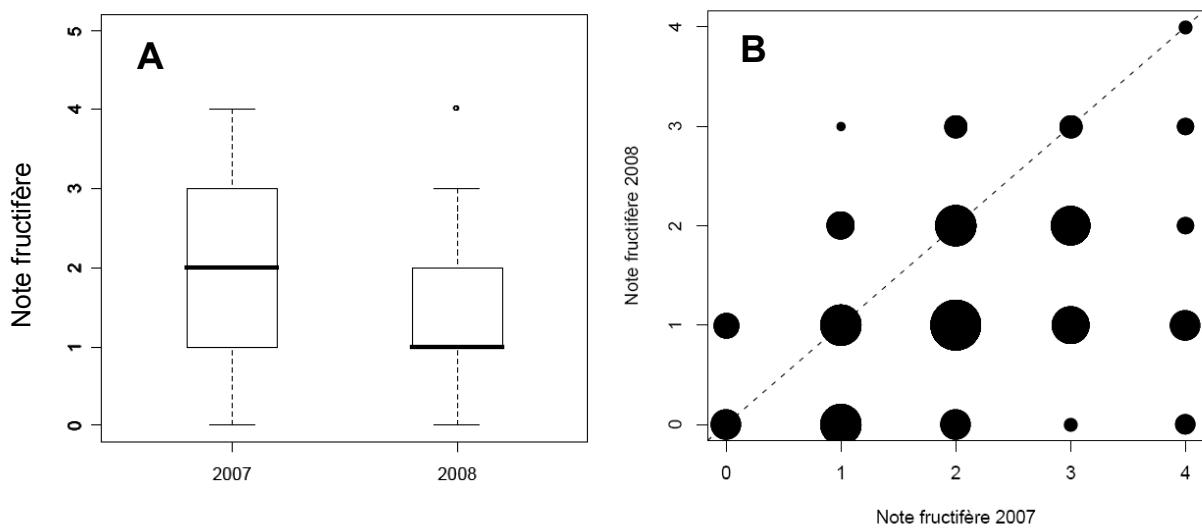


Figure III.9 : (A) Variabilité individuelle observée pour la production de cônes observée en 2007 et 2008 dans la parcelle 951 de la forêt d'Orléans. Dans les boîtes à pattes, la ligne noire représente la valeur médiane. (B) Relation entre la production de cônes observée en 2007 et celle observée en 2008 sur 170 individus communs. La taille du point est proportionnelle au nombre d'individus. La ligne pointillée représente une égalité des notes pour les deux années.

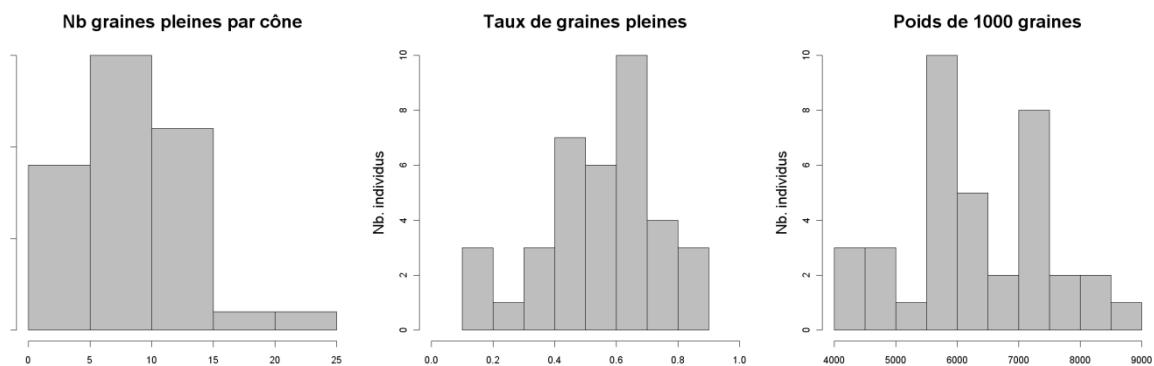


Figure III.10 : Composantes du rendement en graines observées dans 37 descendance maternelles récoltées en 2007 sur le site de la forêt d'Orléans. Les estimations ont été réalisées sur 7 à 34 cônes par descendance.

2008). Sur des arbres adultes d'une hauteur dépassant 20m, il est en effet plus facile d'observer une production de cônes qu'une production de fleurs femelles.

Dans les deux sites d'étude, nous avons pu observer une relative bonne stabilité des classements individuels à la fois pour les critères de floribondité mais aussi pour les précocités de floraison mâle et femelle. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'un contrôle génétique élevé de ces caractères (Fries, 1994).

Cette étude a permis également de mettre en évidence de fortes variations individuelles sur différentes composantes du rendement en graines dont principalement le nombre moyen de graines pleines par cône et le taux de graines pleines. Une observation identique peut être faite au niveau du poids des graines, sous forte influence maternelle, et reconnu contre un facteur déterminant de la croissance des semis durant leur première année aussi bien pour le pin sylvestre (Castro, 1999) que pour d'autres espèces de pin (Blade et Vallejo, 2008). Les semis issus de graines lourdes ont ainsi une croissance plus forte durant leur première année de croissance, alors que par la suite ce sont essentiellement des effets maternels, indépendants de la masse des graines, qui déterminent leur croissance (Castro, 1999). Cette relation entre masse de la graine et croissance juvénile est particulièrement marquée dans des conditions de stress, du moins chez les plantes herbacées (Houssard et Escarré, 1991). On peut se demander si le poids des graines ne sera par alors soumis à sélection, notamment dans les conditions les plus marginales et compte tenu du changement climatique à venir. Etant donné le fort contrôle maternel sur ce critère, il se peut que certaines mères soient favorisées, leur semis ayant une croissance plus forte et donc un avantage par rapport aux autres semis.

En plus des variations interannuelles de capacités de production (Karlsson and Örländer, 2000; Hilli et al., 2008), d'autres facteurs peuvent modifier la production de graines efficaces (i.e la production de graines viables). Chez les conifères, et le pin sylvestre en particulier, il est largement reconnu que la quantité et la qualité du pollen peuvent considérablement réduire la quantité de graines viables produites (Sarvas, 1962 ; Karkkainen and Savolainen, 1993). En effet, une quantité de pollen limitante peut considérablement diminuer le nombre de graines viables produites en raison de la non pollinisation de nombreux ovules (Sarvas, 1962). L'autofécondation, par l'intermédiaire de la dépression de consanguinité, peut aussi réduire considérablement ce taux, suite à des avortement post-zygotiques qui engendrent la formation de graines non viables (i.e graines vides, Karkkainen and Savolainen, 1993).

Marqueur	N	% NA	A	Ae	A _{5%}	Ho	He	Fis	EP	EP cumulée
SPAG 714	456	4,3	35	19,58	8	0,864	0,949	0,09 (n.s)	0,813	0,813
SPAC 125	456	7,6	43	14,08	8	0,921	0,929	0,008(n.s)	0,748	0,953
ctg 4363	456	9,1	33	3,82	4	0,693	0,738	0,061*	0,363	0,970
Ptx 3025	426	11,6	17	2,26	4	0,524	0,557	0,06 (n.s)	0,173	0,975
Estimation multilocus	-	-	-	-	-	0,750 (0,092)	0,790	0,054	0,524	-

Table III.4 : Paramètres de diversité génétiques estimés à l'aide de quatre microsatellites nucléaires dans la population d'arbres adultes du site de Haguenau. **N**, nombre d'individus extraits ; **% NA**, proportion d'individus présentant une donnée manquante au locus ; **A**, nombre d'allèles par locus ; **A_e**, nombre d'allèles efficaces par locus ; **A_{5%}**, nombre d'allèles avec une fréquence supérieure à 5 % ; **Ho**, hétérozygotie observée ; **He**, hétérozygotie attendue ; **F_{IS}**, déficit en hétérozygote ; **EP**, probabilité d'exclusion. Les valeurs moyennes sont données sur la dernière ligne, écart type entre parenthèses. *, p-value<0.05 ;n.s, non significatif au seuil de 5%.

Dans les vergers à graines et les peuplements naturels, plusieurs études ont montré que ces variations individuelles et temporelles de floraison sont à l'origine de variations dans le régime de reproduction (Shen et al., 2007), dans la taille efficace de population (Schoen et Stewart, 1987 ; Dodd et Silvertown 2000 ; Finkeldey et Ziehe 2004) et le niveau de diversité génétique des graines produites (Burczyk et Prat 1997 ; Irwin et al. 2003 ; Nakanishi et al. 2005). Bien que les caractéristiques liées à la reproduction soient sous fort contrôle génétique, il existe une forte variabilité temporelle de ces caractéristiques (Mitton 1992 ; Bila 2000). Caractériser le peuplement reproducteur au niveau des caractéristiques de floraison est donc essentiel pour caractériser la variabilité spatiale et temporelle des caractéristiques reproductrices et leur influence sur la diversité génétique.

3. Diversité génétique neutre du peuplement reproducteur en forêt de Haguenau

3.1 Diversité neutre estimée à l'aide de microsatellites nucléaires...

Le niveau de diversité génétique (A , A_e) observé pour 4 microsatellites nucléaires et le niveau d'hétérozygotie sont très élevés (**Tableau III.4**). Une grande majorité des allèles observés à chacun des loci ont des fréquences inférieures à 5%, mais les deux marqueurs ctg 4363 et Ptx 3025, développés sur d'autres espèces que le pin sylvestre se démarquent par des nombres d'allèles efficaces (A_e) relativement faibles. Ce faible nombre est dû à la présence d'allèles très fréquents à ces loci (fréquences supérieures à 0,7). Un seul marqueur présente un F_{is} significatif (ctg 4363), les autres ne présentant pas d'écart significatif à l'équilibre d'Hardy Weinberg. Le déficit en hétérozygotes obtenu par estimation multilocus est non significatif, comme attendu dans la plupart des études sur des espèces longévives à reproduction préférentiellement allogame.

Il est important d'estimer la probabilité d'exclusion multilocus (EP) attendue avec ces 4 marqueurs pour mesurer la puissance des analyses de paternité conduites ultérieurement. Cette probabilité, EP, est définie comme la capacité moyenne du set de marqueurs à exclure un individu non père lorsque l'on connaît le génotype de la mère et de son descendant. D'après la formule proposée par Jamieson et Taylor (1997), les quatre marqueurs utilisés dans cette étude ont une EP totale de 0.975, suggérant une bonne capacité à mener des analyses de paternité.

Marqueur	N	%NA	N _h	H ₁	H _{eff}	H _{5%}	H _s
Chloros	456	8%	204	118	107.8	0	0.991

Tableau III.5 : Paramètres de diversité haplotypique de la population adulte échantillonnée sur le site de Haguenau. Les haplotypes ont été construits à partir des génotypes à 6 microsatellites chloroplastiques. **N**, nombre d'individus génotypés ; **% NA**, proportion d'individus présentant une donnée manquante pour au moins un des 6 loci ; **N_h**, nombre d'haplotypes ; **H₁**, nombre d'haplotypes uniques ; **H_{eff}**, nombre d'haplotypes efficaces ; **H_{5%}**, nombre d'haplotypes avec une fréquence supérieure à 5 % ; **H_s**, diversité haplotypique.

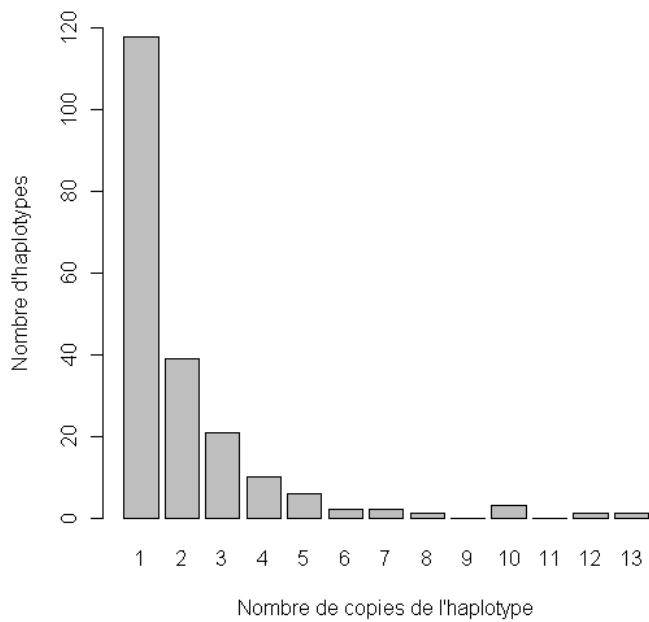


Figure III.11 : Distribution de la fréquence des haplotypes obtenus à l'aide de 6 microsatellites chloroplastiques dans la population adulte échantillonnée sur le site de Haguenau. Les différents haplotypes obtenus sont regroupés en fonction de leur représentation dans la population de semis étudiée (1 à n copies par haplotype).

3.2 ...et diversité génétique neutre estimée à l'aide de microsatellites chloroplastiques

Au total, 32 allèles ont été identifiés pour les 6 microsatellites chloroplastiques étudiés, avec un nombre d'allèles par locus variant de 2 à 8. A partir des fréquences alléliques calculées pour chaque marqueur, nous avons pu observer que chacun des loci possédait une distribution unimodale avec des allèles différents de 1pb chacun, comme espéré. Ces observations confortent le modèle mutationnel pas à pas (stepwise mutation model, SMM) généralement observé pour les microsatellites chloroplastiques (Provan et al., 1998).

La combinaison des allèles aux différents loci permet de différentier 204 haplotypes pour 418 arbres adultes génotypés (**Tableau III.5**). La majorité de ces haplotypes sont uniques (54%) et 20% ont été détectés chez seulement deux individus. Les autres haplotypes sont présents chez 3 à 13 individus (**Figure III.11**). Les haplotypes uniques sont généralement engendrés par une combinaison rare d'allèles plutôt que par la présence d'un ou plusieurs allèles rares (fréquence < 5%). Pour essayer de différencier les adultes qui possédaient le même haplotype, 4 microsatellites chloroplastiques supplémentaires ont été utilisés (Ptx 45002, Ptx 79951, Ptx 87268 et Ptx 41093, Vendramin et al. 1998). Ces derniers n'ont malheureusement pas permis de différencier ces adultes, les nouveaux haplotypes identifiés étant identiques.

3.3 Impact de la tempête de 1999 sur le niveau de diversité génétique neutre

Pour évaluer l'influence de la tempête de Décembre 1999 sur la diversité génétique neutre du peuplement adulte, nous avons comparé pour chaque type de marqueur les paramètres génétiques calculés sur les 88 arbres présents sur le site avant tempête (dont 46 ont disparu après tempête) à ceux issus calculés sur la moyenne de 1000 tirages de 88 arbres parmi les 456 échantillonnés après tempête. Les paramètres suivants ont été utilisés pour comparaison : nombre total d'allèles (ou d'haplotypes), hétérozygotie observée et déficit en hétérozygotes.

Pour prendre en compte la structuration spatiale des dégâts de tempête, les individus présents après tempête ont été tirés en tenant compte des distances entre individus en utilisant une loi du khi-deux proche de la loi de distribution des distances observée pour les individus présents avant tempête. Mille tirages ont été effectués et la valeur observée pour chaque paramètre avant tempête a été comparée à la distribution obtenue à l'issue des 1000 tirages. A partir de ces simulations, il apparaît que comme attendue, la tempête n'a pas modifié le niveau de

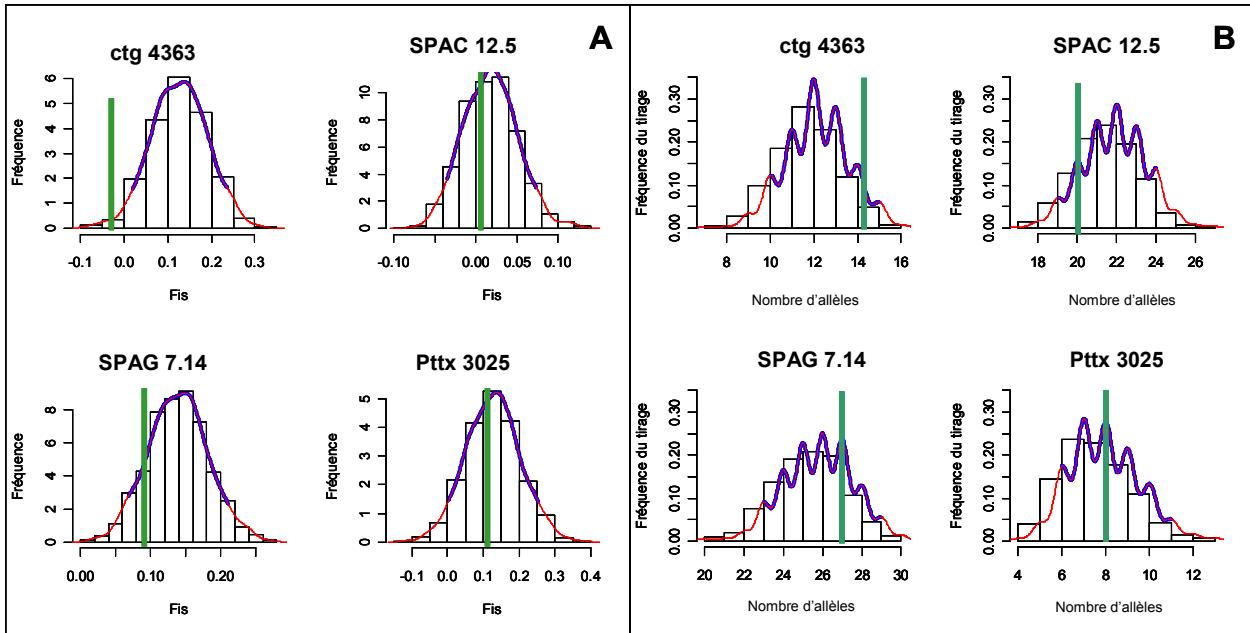


Figure III.12 : Comparaison du déficit en hétérozygotes (A) et de l'hétérozygotie observée (B) estimés à l'aide de 4 microsatellites nucléaires sur des échantillons d'arbres adultes présents avant et après la tempête de décembre 1999. L'histogramme représente la distribution de chaque paramètre pour 1000 tirages de 88 individus réalisés dans la population post tempête. La barre verte représente la valeur du paramètre chez les individus présents avant tempête. La courbe représente la fonction de densité de chaque histogramme. Les parties rouges indiquent les seuils de différence significative au risque $\alpha=0.05$.

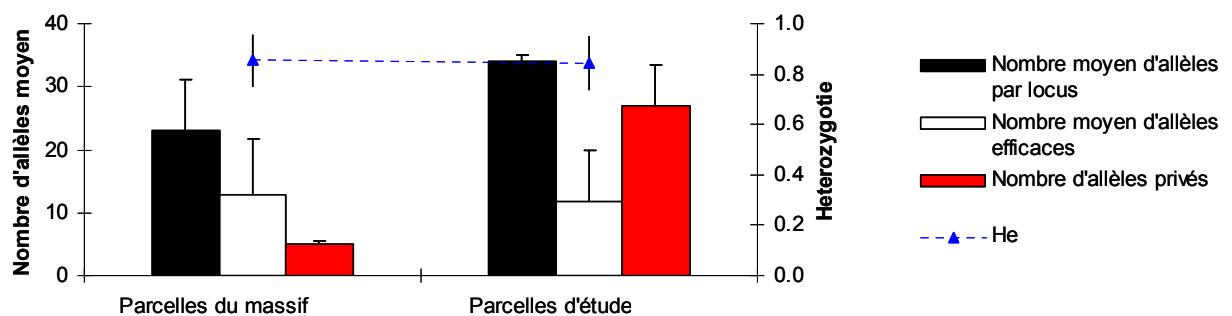


Figure III.13 : Comparaison de la diversité génétique au sein de nos parcelles d'étude (1062, 1063 et 1064) et dans une collection de 116 individus adultes sélectionnés dans 22 autres parcelles autochtones du massif. Les estimations ont été réalisées à l'aide de 4 microsatellites nucléaires.

Diversité haplotypique	N	N _h	H _{eff}	H _p	H _s
Parcelles 1062, 1063, 1064	396	154	86,8	103	0,99
Collection parcelles autochtones Haguenau	99	67	47,3	17	0,98
Voisinage de la parcelle 1064 d'origine inconnue	59	49	42,9	43	0,99

Tableau III.6 : Comparaison de la diversité haplotypique présente dans différentes parcelles du massif de pin sylvestre de Haguenau. Les haplotypes ont été construits à partir des génotypes à 6 microsatellites chloroplastiques. N, nombre d'individus génotypés ; N_h, nombre d'haplotypes ; H_{eff}, nombre d'haplotypes efficaces ; H_p, nombre d'haplotypes privés dans la population ; H_s, diversité haplotypique.

diversité génétique neutre de la population (**Figure III.12**). Bien que drastique, les réductions d'effectifs ne semblent pas avoir altérer la diversité génétique du pin sylvestre à l'échelle de nos trois parcelles. Il reste en effet encore un grand nombre d'individus sur l'ensemble des trois parcelles.

3.4 Comparaison avec la diversité génétique observée au niveau du massif

Nous avons voulu comparer la diversité génétique présente dans nos trois parcelles d'étude à celle observée dans la collection constituant la population d'amélioration d'origine Haguenau autochtone. Cette collection a été rassemblée en 1985 à partir de sélections phénotypiques réalisées dans 25 parcelles autochtones du massif de Haguenau (dont les 3 parcelles étudiées). Pour cela nous disposons d'une évaluation du génotype aux mêmes marqueurs microsatellites pour 116 autres individus sélectionnés dans 22 parcelles autochtones différentes. Aucune différenciation significative n'a pu être mise en évidence à partir des 4 microsatellites nucléaires ($F_{st}=0.006$, $p\text{-value}=0.44$) (**Figure III.13**). Seuls 5 allèles privés non identifiés dans nos trois parcelles ont été trouvés dans ces 22 nouvelles parcelles.

L'analyse de la diversité génétique à déterminisme paternel révèle que 17 haplotypes non présents dans notre population d'étude ont été identifiés dans les autres parcelles autochtones du massif (**Tableau III.6**).

Nous avons voulu également comparer la diversité génétique présente dans nos trois parcelles d'étude à celle observée dans la parcelle d'âge adulte mais d'origine inconnue, située au Nord de la parcelle 1064. Il est intéressant de noter que 43 des 49 haplotypes identifiés dans cette parcelle sont des haplotypes non identifiés dans nos trois parcelles d'étude qui disposent d'une intensité d'échantillonnage bien plus élevée. Ces résultats suggèrent que cette population voisine est probablement issue d'un pool génétique différent du pool autochtone Haguenau. Néanmoins, ces résultats n'ont pu être confirmés à l'aide des microsatellites nucléaires avec lesquels aucune différenciation génétique n'est mise en évidence ($F_{st}=0.0032$, $p\text{-value}=0.65$).

3.5 Discussion

Les marqueurs microsatellites et chloroplastiques utilisés ont permis de mettre en avant la forte diversité génétique neutre présente dans notre peuplement. Les quatre

marqueurs nucléaires utilisés présentent un fort polymorphisme avec un nombre d'allèles par marqueurs similaire à celui observé par Kowaloska (2005) dans des populations polonaises. Parmi les quatre marqueurs nucléaires utilisés, seul le marqueur ctg-4363 possède un F_{IS} significatif. Ce microsatellite a aussi la particularité d'avoir la plus forte diminution entre le nombre d'allèles observés et le nombre d'allèles efficaces. La présence d'allèles nuls peut permettre d'expliquer ce F_{IS} , bien que des analyses sur les descendances maternelles ne mettent en évidence aucune absence de ségrégation entre une mère et ses descendants pour ce marqueur.

Les six marqueurs microsatellites utilisés ont permis de créer un grand nombre d'haplotypes, dont la plupart sont uniques. La diversité observée dans nos parcelles de Haguenau est comparable à celle d'autres peuplements naturels de pin sylvestre (Provan et al., 1998 ; Robledo et al., 2005) mais supérieure à celle observée chez d'autres espèces de pin (Morgante et al., 1997 ; Powell et al., 1995). De manière identique à la diversité génétique basée sur des marqueurs nucléaires (Prus-Glowacki et al., 1993), la majorité de la variation présente aux loci chloroplastiques est contenu à l'intérieur des populations (plus de 90%, Provan et al., 1998 ; Robledo et al., 2005). Malgré la plus faible différenciation entre populations pour les marqueurs à hérédité paternelle par rapport aux marqueurs à hérédité maternelle couramment utilisés en phyléogéographie (Petit et al., 2005), certaines études basées sur les haplotypes (Vendramin et al., 2000 ; Echt et al., 1998, Szmidt et al. 1996) ou sur les fréquences alléliques à chaque locus (Ribeiro et al., 2002), mettent en évidence l'existence d'une structuration spatiale de la diversité chloroplastique chez des espèces à répartition discontinue ou fragmentée. Cette différenciation est toutefois beaucoup plus faible dans le cas d'espèces à large répartition continue (Vendramin et al., 2000) et rend difficile l'utilisation de marqueurs chloroplastiques comme marqueurs de provenance génétique (différenciation possible au niveau populationnel mais difficile au niveau individuel sauf pour haplotypes rares).

Etant donné que chaque haplotype identifié correspond à un individu, la forte diversité observé en terme de nombre d'haplotypes (204 pour 418 individus) suggère une taille de population reproductrice mâle élevée à la génération n-1. La population mâle qui est à l'origine des 418 individus adultes génotypés dans nos parcelles est donc d'au moins 204 individus et probablement supérieure en raison de l'impossibilité de différencier certains individus sur la base de ces six marqueurs (haplotypes non uniques).

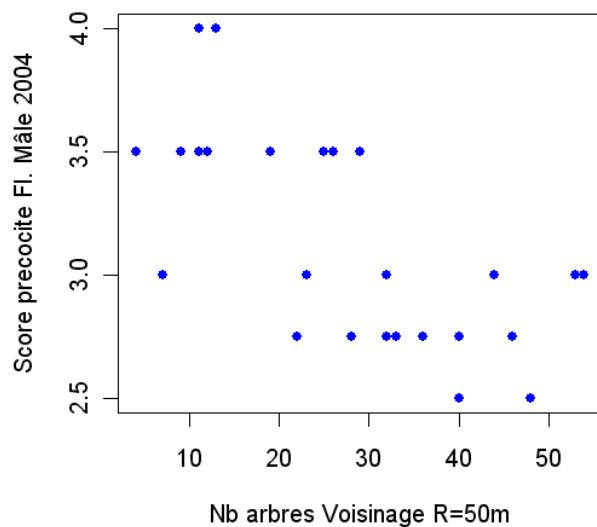


Figure III.14 : Relation entre densité locale de reproducteurs (dans un voisinage de rayon 50m) et note de précocité de floraison mâle observée en 2004 sur le site de Haguenau.

Année	AFF	AFM	PFF	PFM
2004	0,03 (n.s)	0,039 (n.s)	0,138 (n.s)	0,15*
2005	0,013 (n.s)	0,028 (n.s)	0,019 (n.s)	-0,02 (n.s)
2006	0,06 (n.s)	0,048 (n.s)	-0,008 (n.s)	0,15 (n.s)

Tableau III.7 : Coefficients d'autocorrélation spatiale de Mantel (r_m) pour différents descripteurs des floraisons mâle et femelle observées sur le site de Haguenau en 2004, 2005 et 2006. **AFF**, abondance de la floraison femelle ; **AFM**, abondance de la floraison mâle ; **PFF**, précocité de la floraison femelle et **PFM**, précocité de la floraison mâle.

L'étude de la diversité présente dans d'autres parcelles du massif démontre que nos parcelles d'études sont représentatives de la ressource génétique Haguenau. Aucune différenciation génétique n'a pu être mise en évidence entre nos parcelles et la diversité à l'échelle du massif. Utiliser ces parcelles pour caractériser le pool Haguenau semble donc possible et peut servir de base pour la comparaison de la diversité d'autres parcelles ou vergers à graines.

Alors que nous n'avons pas trouvé de différence au niveau nucléaire entre nos parcelles et une autre parcelle potentiellement considérée comme non autochtone, il apparaît toutefois que celle-ci possède des haplotypes non représentés dans la population Haguenau. Comme le souligne Ribeiro et al.(2002) il semble donc possible de caractériser les origines génétique à partir de marqueurs chloroplastiques. Ce résultat peut être d'une importance considérable pour évaluer la pollution génétique dans les peuplements ou les vergers d'origine Haguenau.

4. Structuration spatiale au sein du peuplement reproducteur

4.1 Une quasi-absence de structuration spatiale des caractéristiques de floraison

L'analyse de la structuration spatiale de la variabilité observée pour les caractéristiques individuelles de floraison (phénologie et floribondité) a été réalisée en deux temps. Nous avons dans premier temps étudier la relation entre performances individuelles et densité locale en arbres reproducteurs, (1) en testant l'existence de différences entre les parcelles étudiées qui diffèrent significativement pour cette densité de reproducteurs et (2) en décrivant la relation entre performances et nombre d'arbres adultes présents dans un voisinage de rayon 50m. Nous avons ensuite profité du géoréférencement de tous les arbres adultes pour réaliser une analyse d'autocorrélation spatiale pour détecter d'éventuelles structuration spatiale des performances de floraison.

Quel que soit le type de floraison étudié sur le site de Haguenau et pour les différentes années d'observation, nous n'avons pas trouvé d'effet significatif de la densité de reproducteurs sur l'abondance de fleurs, ni au niveau parcelle, ni au niveau individuel. Aucun effet significatif de la densité de reproducteurs n'a également pu être observé sur la phénologie de floraison femelle. La seule relation significative mise en évidence concerne la précocité de la floraison mâle observée en 2004 (**Figure III.14**, corrélation de Pearson : $r = -0.345^*$). Les arbres relativement isolés semblent présenter une floraison mâle légèrement plus précoce d'une demi-classe voire d'une classe à une classe. Ce phénomène non validé les autres années où les

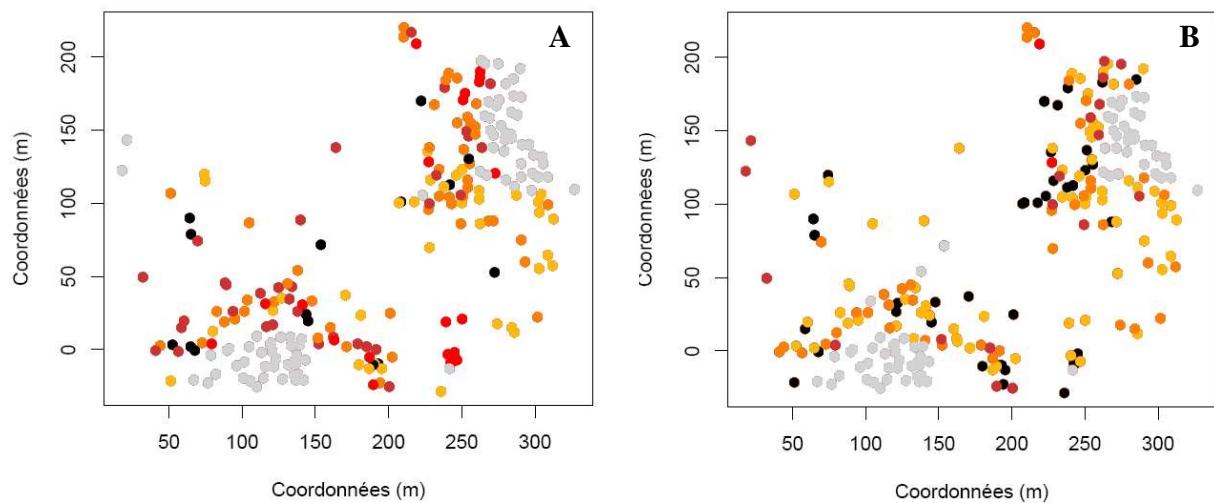


Figure III.15 : Distribution spatiale des notes de production de cônes observées en 2007 (A) et en 2008 (B) en parcelle 951 de la forêt d'Orléans. Le niveau de production de cônes est noté du jaune (arbre peu fructifère) au rouge (arbre très fructifère). Les points noirs représentent les individus non fructifères, les points gris les individus non inclus dans l'échantillon observé.

	Dmin	N30	N50
P951-2007	0,26 n.s	0,66***	0,67***
P951-2008	0,22 n.s	0,60***	0,61***
Haguenau-2004	0,3 n.s	0,21 n.s	0,2 n.s

Tableau III.8 : Valeurs des corrélations de Pearson entre le taux de graines pleines estimé à l'aide de descendances maternelles et différentes caractéristiques du voisinage de l'arbre-mère récolté. **Dmin**, Distance à l'arbre le plus proche ; **N30**, Nombre d'arbres dans un rayon de 30m et **N50**, Nombre d'arbres dans un rayon de 50m.

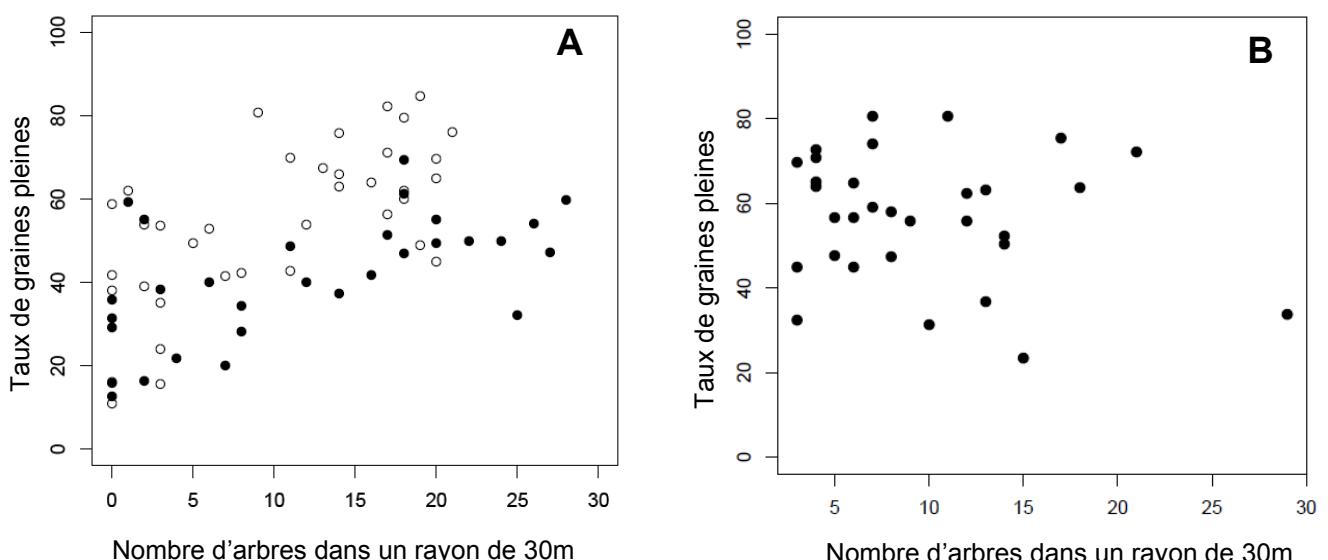


Figure III.16 : Relations entre la densité locale de reproducteurs dans un voisinage de rayon 30m et le taux de graines pleines observées respectivement sur le site d'Orléans (A) et le site de Haguenau (B). Sur le site d'Orléans, les points noirs représentent l'année 2007, les points blancs l'année 2008.

observations ont été réalisées plus tardivement pourrait s'expliquer par une accélération de la dynamique de floraison lorsque les houppiers sont mieux éclairés.

Aucune structuration spatiale des floribondités mâle et femelles ou des phénologies de floraison n'a pu être mise en évidence (**Tableau III.7**). Il n'existe donc pas, au sein de notre site d'étude, de zones où la floraison est plus abondante ou plus précoce en dehors de la structuration entre parcelles pour la précocité de la floraison mâle de 2004 signalée précédemment.

4.2 Une structuration spatiale de la production de graines liée à la densité locale de reproducteurs

L'analyse de la structuration spatiale de la variabilité observée pour les caractéristiques individuelles de production de cônes a été réalisée sur le site d'Orléans où les observations ont porté sur deux années sur un assez grand nombre d'individus. A l'échelle de la parcelle, aucune structuration spatiale des productions individuelles de cônes n'a pu être mise en évidence en 2007 ($r_m = 0.08$ n.s) ou 2008 ($r_m = 0.03$ n.s). A l'échelle individuelle, la densité locale de reproducteurs très variable dans ce peuplement ne semble pas influencer la production de cônes, elle-même très liée à la production de fleurs femelles l'année précédente (**Figure III.15**).

Lorsqu'on s'intéresse plus précisément aux différentes composantes du rendement en graines, on peut mettre en évidence pour 2007 et 2008 une relation significative entre la densité locale de reproducteurs et le taux de graines pleines (**Tableau III.8**). Les arbres-mères présentant des taux de graines pleines inférieurs à 40% présentent tous une taille de voisinage souvent bien inférieure à 10 arbres reproducteurs (**Figure III.16 A**). Cette relation ne semble pas significative sur le site d'Haguenau (**Figure III.16 B**).

4.3 Structuration spatiale de la diversité génétique neutre

4.3.1 Mise en évidence d'une structuration spatiale de la diversité génétique à l'aide de microsatellites nucléaires

A partir des génotypes aux 4 microsatellites nucléaires, nous avons analysé les variations de l'apparentement entre couples d'individus (mesuré par le coefficient d'apparentement de Loiselle F_{ij}) en fonction de la distance entre chaque paire d'individus. Le coefficient de la pente entre distance spatiale et coefficient d'apparentement est significativement inférieur à 0 ($b_0 = -0.0013^*$). On peut ainsi rejeter l'hypothèse nulle d'absence de structuration génétique

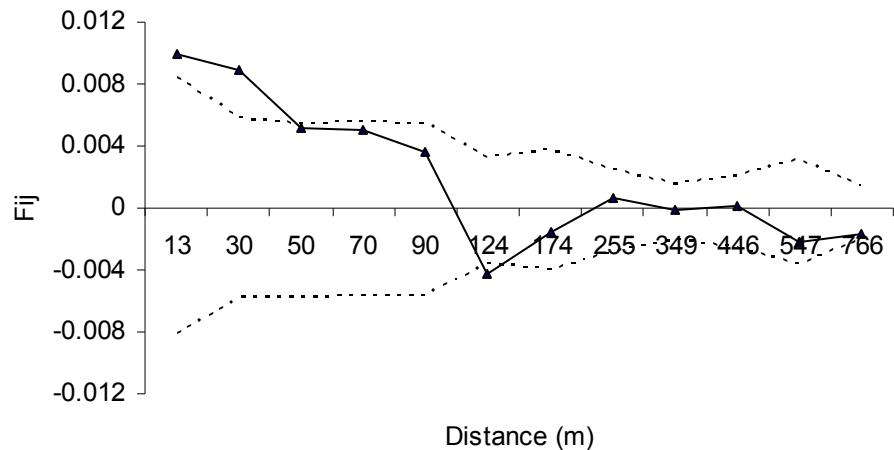


Figure III.17 : Corrélogramme de l'apparentement entre individus, calculé à l'aide de 4 microsatellites nucléaires selon l'indice de Loiselle (F_{ij}) en fonction de leur distance géographique. Les pointillés indiquent l'intervalle de confiance à 95% de l'hypothèse nulle de structuration spatiale.

Répartition des haplotypes fréquents

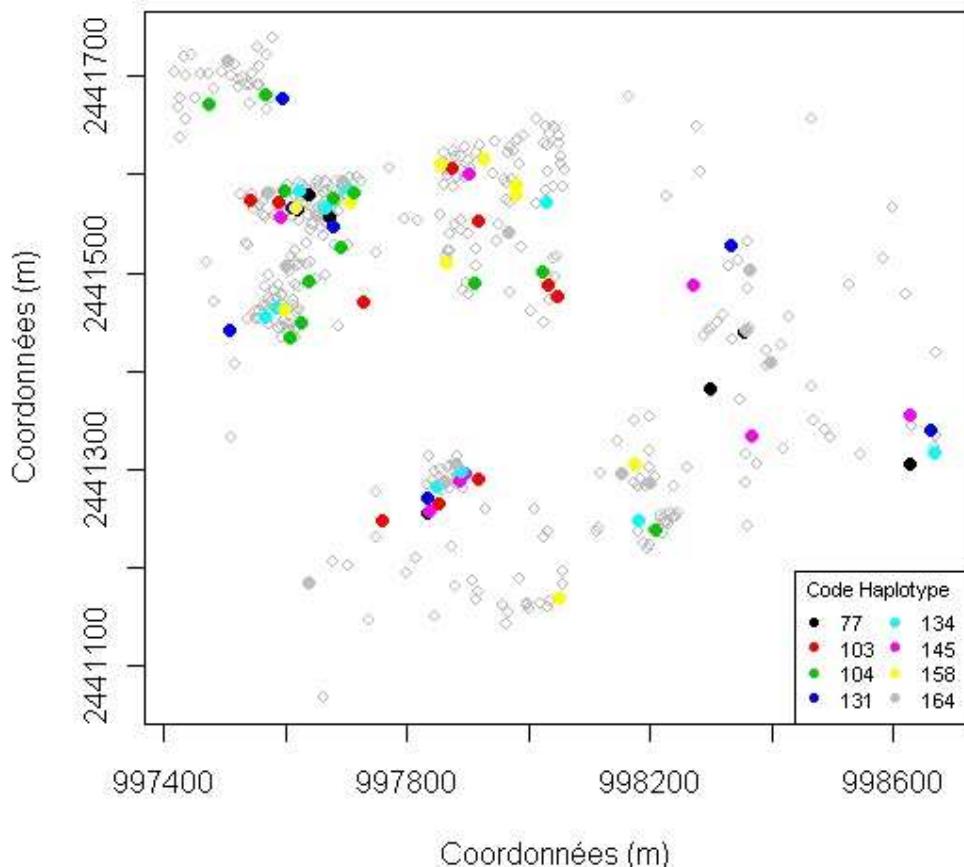


Figure III.18 : Distribution spatiale des 8 haplotypes les plus fréquents de la population d'arbres reproducteurs du site de Haguenau. Les haplotypes ont été définis à l'aide de 6 microsatellites chloroplastiques.

spatiale (SGS) dans le peuplement. Cette valeur négative met en évidence une diminution de l'apparentement lorsque la distance géographique séparant deux individus augmente. Le corrélogramme obtenu par cette approche (**Figure III.17**) montre que les individus sont plus apparentés que sous l'hypothèse nulle de répartition aléatoire des génotypes dans l'espace pour des distances entre arbres d'environ 30m.

Lorsque l'analyse est conduite séparément dans les trois parcelles d'études de densité différentes, une SGS n'est détectée que dans la parcelle 1064 qui présente la plus forte densité de reproducteurs.

4.3.2 Aucune structuration spatiale de la diversité génétique décrite à l'aide de microsatellites chloroplastiques

Une analyse identique a été réalisée sur les données haplotypiques issues du génotypage des individus à l'aide des 6 microsatellites chloroplastiques. Aucune DGS significative ne peut être détectée ni à l'échelle du peuplement, ni à celle de la parcelle ($b_0=0.001$, n.s.). Cette absence de structuration spatiale de la diversité chloroplastique est facilement observable en représentant la distribution spatiale des huit haplotypes les plus fréquents qui apparaissent bien dispersés sur l'ensemble du site (**Figure III.18**).

4.4 Discussion :

4.4.1 Une structuration spatiale à différents niveaux

D'une manière générale, les études chez les pins sur la structuration spatiale à l'échelle du peuplement ont abouti à l'observation d'une faible mais significative structuration génétique spatiale (Jones et al., 2005 ; Epperson et Chung, 2001 ; Gonzales-Martinez et al., 2002). Les individus apparaissent ainsi être plus apparentés pour des distances généralement inférieures à 20m et non apparentés pour des distances supérieures (Epperson et Chung, 2001 ; Marquardt et Epperson, 2004, Walter et Epperson, 2004). La plupart de ces études s'appuient cependant sur des marqueurs nucléaires ne permettant pas ou du moins difficilement, de différencier les conséquences de la dispersion des gènes par pollen et par graines sur cette structuration. Bien que le pin sylvestre soit une espèce largement répandue à l'échelle du continent européen, cette étude est la première à notre connaissance qui compare la structuration de la diversité génétique à l'échelle individuelle pour deux types de marqueurs à hérédité différente. Pour les marqueurs nucléaires, nous avons observé de manière identique à Chybicki et al. (2008) la

présence d'une structuration spatiale significative, bien que relativement faible (b_0 proche de 0). Un apparentement significatif, indiquant la présence de cercles de consanguinité (Hamrick et Nason, 1996) apparaît jusqu'à des distances de 30m ; puis cet apparentement devient non significatif pour des distances plus élevées. L'existence d'une structuration dans ce peuplement géré reste tout de même originale étant donné que les structurations sont généralement observées dans des peuplements naturels non gérés (Takahashi et al., 2008 ; Chybicki et al., 2008). Des flux de graines restreints sont souvent cités comme étant le facteur principal de la présence d'une forte structuration spatiale (Epperson 2003). Nous pouvons donc supposer que cette structuration spatiale est due à une dispersion des graines limitée dans l'espace jusqu'à une distance de 30m. Une forte densité d'individus ou une forte capacité de dispersion des graines peut cependant masquer l'effet d'une dispersion limitée dans l'espace, en permettant le recouvrement des fenêtres de dispersion et le mélange d'individus issus de différentes origines (Jones et al., 2006 ; Takahashi et al., 2001). La relativement faible structure observée ici semble toutefois être due à une densité élevée d'individus à la génération précédente, étant données les faibles capacités de dispersion des graines généralement observées chez les pins (Guittet et Laberche, 1974 ; Camarero et al., 2005). L'absence de structuration spatiale pour les marqueurs chloroplastiques confirme que la structuration spatiale observée au niveau nucléaire est due à une dispersion limitée des graines, les flux de pollén n'ayant aucune influence sur celui-ci. Un patron identique a été observé chez un conifère japonais (*Cryptomeria japonica*, Takahashi et al., 2008) et confirme les fortes capacités de dispersion du pollén chez les pins (Robledo et Gil, 2005). La présence d'une absence de structuration génétique au niveau chloroplastique confirme aussi que les arbres-mère à l'origine de ce peuplement ont été pollinisés par un grand nombre de pères différents. En effet, dans le cas extrême où un arbre mère est pollinisé par un seul père, on peut s'attendre, suite à une dispersion limitée des graines, à l'existence d'une structuration génétique au niveau chloroplastique, étant donné que toutes les graines dispersées sont plein frères.

Compte tenu du fort contrôle génétique des caractères liés à la reproduction (Bryam et al., 1986; Fries, 1994), on peut s'attendre à ce que la structuration spatiale de la diversité génétique induise une structuration au niveau phénotypique (Nanos et al., 2004). Aucune structuration spatiale de la floraison n'a pu être mise en évidence à l'échelle individuelle, probablement en raison d'un échantillonnage trop lâche par rapport à l'échelle de structuration génétique spatiale. Mis à part pour l'année 2004, aucune différence entre

parcelles n'a pu être mise en évidence, bien que des variations locales de type de sols puissent modifier l'abondance de la floraison (Nanos et al., 2004).

Aucune corrélation entre la densité d'individus et l'abondance de floraison ou de fructification n'a pu être mise en évidence, alors que l'on pouvait s'attendre à une augmentation de la floraison dans les zones les moins dense (Karlsson, 2000 ; Debain et al., 2003) en raison des différences d'utilisation des ressources. De même la densité locale n'influe pas sur le poids de graines, démontrant que le contrôle maternel joue un rôle plus fort que la compétition entre individus. Bien que le classement des individus soit conservé, le poids des graines peut toutefois fortement varier d'une année à l'autre en raison des différences de disponibilité des nutriments ou de l'eau (Castro et al., 1999).

4.4.2 Importance de l'environnement sur la production de graines

Alors que Schurr et al. (2008) montrent que la densité joue sur la capacité de production de cônes, l'influence de la densité en forêt d'Orléans apparaît au niveau de la capacité de production de graines et notamment le taux de graines vides par cône. Cette corrélation peut être la conséquence de deux phénomènes: une pollinisation insuffisante en quantité pour les arbres isolés étant donnée la relation négative entre le taux de graines vides et la quantité de pollen disponible (Sarvas, 1962), ou le résultat de la dépression de consanguinité étant donnée la forte corrélation entre l'isolement et le taux d'autofécondation (Robledo et al., 2004b). Le fait que la distance à l'arbre le plus proche (D_{min}) n'ait aucune influence sur le taux de graines vides laisse toutefois supposer que la quantité de pollen joue un rôle essentiel dans la structuration spatiale de la production de graines.

Il est intéressant de noter qu'à Haguenau, aucune structuration spatiale de la capacité de production de graines n'a pu être mise en évidence. Cette différence semble essentiellement due à la différence d'environnement entre la parcelle d'Orléans et celles de Haguenau. Alors qu'à Orléans, notre parcelle est relativement isolée dans un massif de chênes, les parcelles en forêt de Haguenau sont situées en plein cœur d'un large massif de pins. La quantité de pollen produite par les pins de la parcelle 951 est insuffisante pour polliniser convenablement tous les arbres de la parcelle et notamment les plus isolés. En forêt de Haguenau en revanche, même si les arbres des parcelles produisent relativement peu de pollen, la proximité d'immenses zones de pins permet une pollinisation suffisante en quantité, compte-tenu de la capacité de dispersion du pollen relativement élevée chez le pin sylvestre.

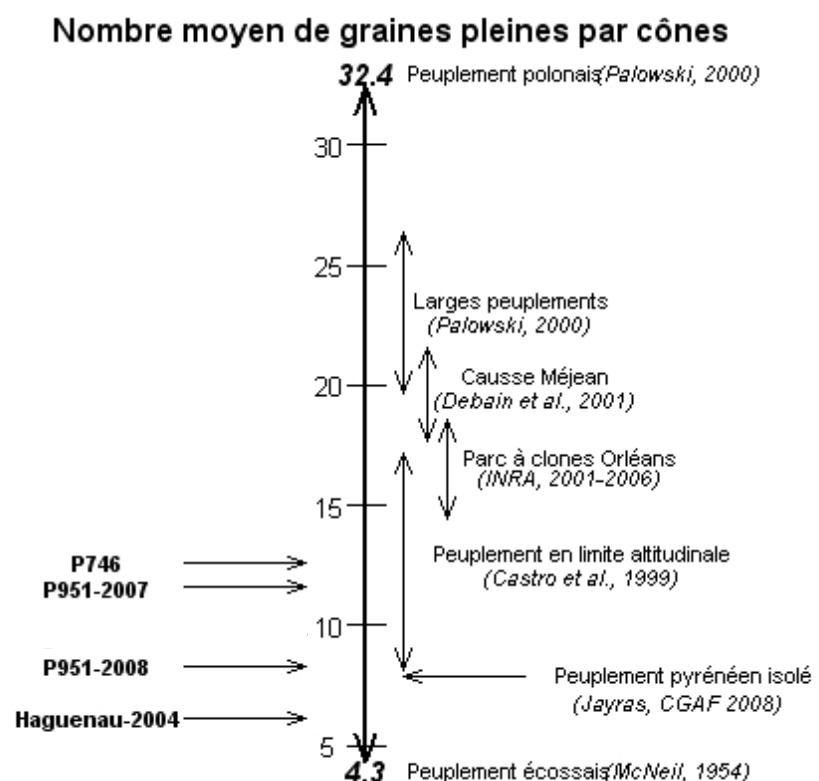


Figure III.19 : Comparaison des capacités de production de graines au sein de nos parcelles en fonction de l'éventail de valeur trouvées dans la bibliographie ou dans des données internes du CGAF ou de l'INRA.

D'une manière générale, et malgré la forte variabilité interannuelle, le nombre moyen de graines par cône observé dans notre étude est relativement faible. Pour le cas de Haguenau, la faible capacité de production de graines semble être due à l'âge élevé des individus (200 ans environ) alors que pour les parcelles de la forêt d'Orléans, c'est plutôt l'environnement pauvre en pin qui engendre la faible production de graines. La quantité de graines produites par cône se rapproche de celles de peuplements en marge d'aire de distribution, (Castro et al., 1999) situés dans des conditions écologiques non optimales (Catalán, 1991; Hódar et al., 2003), et produisant généralement moins de graines que les autres (Geburek et Turok, 2005, **Figure III.19**). Il apparaît ainsi qu'un âge trop avancé des individus, ou une situation d'isolement trop fort, peut considérablement diminuer la capacité de production de graines et donc perturber la mise en place de la régénération naturelle.

5. Conclusion

Nous avons montré qu'il existait dans les peuplements forestiers étudiés une forte diversité individuelle à la fois au niveau génétique et au niveau des capacités reproductrices. La sylviculture menée depuis de nombreuses générations n'a donc pas altéré la diversité génétique, ni sélectionné ou contre-sélectionné d'individus sur les critères de capacité reproductrice.

Notre étude nous a montré par ailleurs qu'il existait de fortes variations temporelles de floraison/fructification. Ces variations temporelles sont d'une importance considérable pour la mise en place de la régénération étant donné qu'il peut exister des années où très peu de cônes sont produits, ce qui diminue fortement l'efficacité de la mise en régénération. Lors de ces mauvaises années, la production de graines par cône est elle aussi réduite ce qui diminue encore plus fortement la capacité de production de graines du peuplement. Par ailleurs, l'âge relativement avancé des individus sur le site Haguenau engendre un diminution de la production de graines, ceux-ci se situant à des niveaux relativement bas par rapport à ceux couramment observés.

Un des résultat important de cette étude est l'influence de la densité locale sur la capacité de production de graines dans les peuplements isolés. Il apparaît ainsi que dans un peuplement isolé, les individus situés dans des situations de faible densité ont une capacité reproductrice plus faible en raison du fort taux de graines vies produites.

Malgré la gestion forestière menée depuis de nombreuses années dans ces peuplements, il réside toujours une structuration spatiale de la diversité génétique, démontrant que la

sylviculture ne suffit pas à briser les cercles de consanguinité engendrés par une dispersion des graines limitée dans l'espace. Malgré cette structuration spatiale, les capacités reproductrices n'apparaissent pas être structurées dans les peuplements.

Etant donné que les caractéristiques du peuplement reproducteur influencent fortement la diversité génétique des graines produite, la caractérisation des populations adultes est une étape préalable indispensable à l'analyse des flux de pollen et de graines. Au regard des informations obtenues dans ce chapitre, nous pouvons désormais nous attacher à la caractérisation des flux de pollen et à la formation des graines.

Chapitre IV

Dispersion du pollen : de l'unité de gestion à l'unité de reproduction



Objectifs	Matériel végétal	Outils	Méthodes	Références Chapitre II
Diversité génétique des descendances maternelles	31 descendances maternelles (743 graines)	3 marqueurs microsatellites nucléaires 6 marqueurs microsatellites chloroplastiques	Mesures de paramètres de diversité génétique	Matériel végétal : § 113 Méthodes : § 211
Paramètres du régime de reproduction	31 descendances maternelles (743 graines)	3 marqueurs microsatellites nucléaires 6 marqueurs microsatellites chloroplastiques	Mixed mating model	Matériel végétal : § 113 Méthodes : § 214
Différenciation des nuages polliniques	31 descendances maternelles (743 graines)	3 marqueurs microsatellites nucléaires 6 marqueurs microsatellites chloroplastiques	AMOVA	Matériel végétal : § 113 Méthodes : § 212, 213
Capacités de dispersion du pollen	20 descendances maternelles (540 graines) et adultes	3 marqueurs microsatellites nucléaires 6 marqueurs microsatellites chloroplastiques	Analyses de paternité	Matériel végétal : § 113 Méthodes : § 215

Tableau IV.1 : Récapitulatif du matériel végétal et des outils utilisés dans les études du chapitre IV sur le site de Haguenau. Pour plus de détails, se référer au chapitre II.

Chapitre IV : Dispersion du pollen : de l'unité de gestion à l'unité de reproduction

1. Rappel des matériels et méthodes utilisés

L'analyse des flux de pollen sur le site de Haguenau repose sur la récolte de descendances maternelles correspondant à des évènements de pollinisation 2002. L'échantillonnage des arbres-mères réalisé a été contraint par le faible niveau global de fructification des 3 parcelles. Les 31 arbres retenus sont tous de fructification moyenne à élevée en 2004 et cherchent à représenter le gradient de densité locale de reproducteurs observé sur les 3 parcelles. En moyenne 24 graines par descendance (de 3 à 38) ont été génotypées pour caractériser le niveau de diversité génétique de la population de graines produites (**Tableau IV.1**). La structuration génétique en descendances maternelles a également permis l'estimation du taux d'autofécondation et des écarts à un régime de reproduction panmictique.

L'analyse de parenté a été réalisée sur un sous-ensemble de 20 descendances maternelles représentant le gradient de densité locale de reproducteurs et pour lesquelles un effort de caractérisation génétique du voisinage était disponible dans un rayon minimum de 50m (zones d'inventaire exhaustif d'arbres adultes, **Figure II.5 – Tableau IV.1**). Cette analyse a permis d'aller au-delà d'une détection de différenciation entre nuages polliniques en précisant les capacités individuelles de dispersion des pères identifiés.

L'analyse des données de génotypage sur les marqueurs à hérédité biparentale et paternelle a été réalisée séparément dans un premier temps puis conjointement lorsque cela a été possible (analyses de paternité notamment). Les résultats obtenus ont été mis en relation avec les différents descripteurs physiques et biologiques de la population de reproducteurs : densité de pins dans un rayon de 30m, abondance et précocité de floraison. Une attention particulière a été portée à la mise en évidence d'un effet du gradient de densité de reproducteurs entre les 3 parcelles et à la quantification de flux de pollen hors parcelle.

Marqueur	N	% données manquantes	A	A _e	A _{5%}	H _o	H _e	F _{is}
SPAG 714	743	4,4	40	19,25	6	0,93	0,95	0,02 (n.s)
SPAC 125	743	3,9	34	13,37	9	0,92	0,93	0,01 (n.s)
Ctg 4363	743	5,6	22	4,76	3	0,72	0,78	0,07 ***
Estimation multilocus	-	-	-	-	-	-	0,88	0,03 (n.s.)

Tableau IV.2 : Diversité génétique moyenne des 31 descendances maternelles récoltées à Haguenau, aux 3 loci nucléaires. N, nombre de graines génotypées ; A, nombre d'allèles observés ; Ae, nombre d'allèles efficaces ; A_{5%} : nombre d'allèles de fréquence supérieure à 5% ; Ho, hétérozygotie observée ; He, hétérozygotie attendue ; Fis, déficit en hétérozygote estimé (test d'égalité à 0, **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; n.s non significatif).

Parcelle	t _m	t _s	t _m - t _s
1064 (50 pins/ha)	1,12 (0,02)	1,03 (0,07)	0,08 (0,07)
1063 (21 pins/ha)	1 (0,01)	0,95 (0,04)	0,05 (0,03)
1062 (12 pins/ha)	0,96 (0,08)	0,91 (0,05)	0,05 (0,04)

Tableau IV.3 : Estimation du taux d'allofécondation multilocus (t_m) et simple locus (t_s) aux 3 loci nucléaires pour les 31 descendances maternelles de Haguenau regroupées par parcelle. La différence t_m – t_s permet d'estimer le taux de fécondation entre individus apparentés. Les écart-types sont indiqués entre parenthèse.

2. Caractérisation de la diversité génétique dans les descendances maternelles issues de pollinisation libre

2.1 Caractérisation de la diversité génétique des graines à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires

Le niveau de diversité génétique (A , A_e) observé pour 3 microsatellites nucléaires est élevé et comparable à celui observé dans la population de reproducteurs (**Tableau IV.2**). Il est à noter la présence, dans la population de graines génotypées, de 5 allèles privés peu fréquents pour le seul locus SPAG 714. Le niveau d'hétérozygotie observée est en moyenne très élevé et se révèle légèrement supérieur à celui observé dans la population de reproducteurs. Aucun déficit significatif d'individus hétérozygotes (F_{is}) n'est observé au niveau multilocus même s'il est détecté à l'aide du marqueur ctg 4363. Le taux d'allofécondation multilocus (t_m) est très élevé et confirme le très faible pourcentage de graines pleines issues d'autofécondation, déjà observé chez le pin sylvestre. La différence $t_m - t_s$, qui permet d'estimer le taux moyen de croisement entre individus apparentés est elle aussi faible (**Tableau IV.3**).

Pour un effort d'échantillonnage donné intra descendance, les estimations de diversité multilocus et de niveau d'hétérozygotie observée varient peu d'une descendance à l'autre. Seules 2 descendances (2004-15 et 2004-32) présentent une diversité allélique et un niveau d'hétérozygotie relativement faible (respectivement 0,38 et 0,27) (**Tableau IV.4**).

2.2 Caractérisation de la diversité génétique des graines à l'aide de marqueurs microsatellites d'origine paternelle

A partir des 715 graines génotypées (3,8% de données manquantes) à l'aide de 6 microsatellites chloroplastiques, 186 haplotypes différents ont pu être définis dont 82 n'ont pas été détectés dans la population de reproducteurs (**Tableau IV.5**). A l'inverse, 90 des 204 haplotypes de la population de reproducteurs ne sont pas détectés dans la population de graines étudiée. Si 78 haplotypes (42%) ne sont représentés que par une seule graine, certains d'entre eux se révèlent particulièrement fréquents dans la population de graines (**Figure IV.1**). Il est à noter qu'ils correspondent en très grande majorité à des haplotypes fréquents dans la population de reproducteurs. La diversité haplotypique de l'ensemble des descendances est très élevée ($H_s = 0,986$).

Descendance	N	Loci nucléaires				
		A	Ae	A _{5%}	Np	He
684	28	12,7	4,2	2,3	0,3	0,76
697	18	9,0	3,7	4,7	0,0	0,67
2004-01	36	15,3	4,6	4,0	0,3	0,78
2004-02	15	6,7	3,2	4,7	0,0	0,53
2004-04	20	6,7	3,8	5,0	0,3	0,55
2004-05	38	15,3	4,4	3,3	0,3	0,76
2004-07	3	5,3	2,9	3,0	0,0	0,50
2004-08	36	14,7	4,1	3,3	0,7	0,71
2004-09	16	5,0	2,8	2,3	0,0	0,50
2004-10	35	11,7	4,3	4,0	0,0	0,73
2004-11	20	5,0	3,5	5,0	0,0	0,54
2004-14	20	6,3	3,5	3,7	0,3	0,54
2004-15	19	6,7	1,6	1,7	0,3	0,38
2004-16	14	4,3	3,1	3,7	0,0	0,51
2004-17	29	11,3	4,4	4,3	0,0	0,75
2004-20	12	3,3	2,7	3,3	0,0	0,48
2004-21	19	6,0	2,8	3,0	0,3	0,51
2004-22	14	5,0	2,9	2,7	0,0	0,51
2004-23	20	5,0	2,7	5,0	0,0	0,50
2004-24	19	6,0	3,0	2,0	0,3	0,49
2004-25	20	7,0	3,7	5,0	0,0	0,54
2004-26	37	12,3	4,5	4,0	0,7	0,77
2004-27	19	6,0	3,4	4,3	0,0	0,53
2004-28	35	13,7	4,2	3,7	0,0	0,69
2004-29	20	7,3	3,4	3,3	0,0	0,53
2004-30	20	2,7	2,0	2,7	0,0	0,44
2004-31	32	13,3	5,0	5,3	0,0	0,79
2004-32	15	2,7	1,8	2,7	0,0	0,27
2004-33	18	5,3	2,3	2,0	0,0	0,47
2004-34	33	13,0	4,2	4,0	1,0	0,67
2004-35	35	15,0	4,3	3,0	0,7	0,76

Tableau IV.4 Diversité génétique multilocus de chacune des 31 descendance maternelles récoltées à Haguenau, mesurée avec les 3 marqueurs microsatellite nucléaires. N, nombre de graines génotypées ; A, nombre d'allèles observés ; Ae, nombre d'allèles efficaces ; A_{5%} : nombre d'allèles de fréquence supérieure à 5% ; He, hétérozygotie attendue.

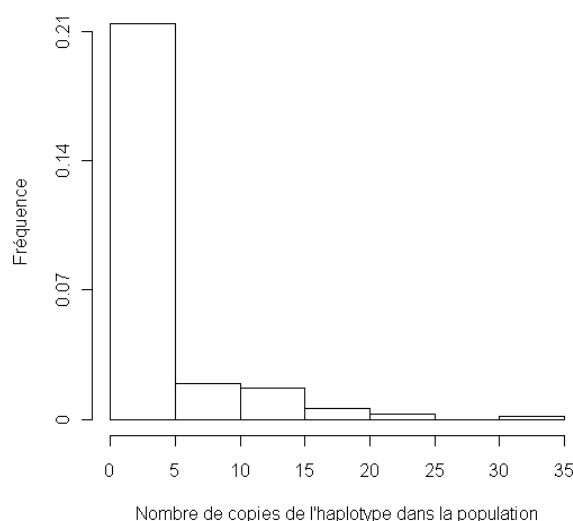


Figure IV.1 : Distribution de la fréquence des haplotypes obtenus à l'aide de 6 microsatellites chloroplastiques dans les 31 descendance maternelles récoltées à Haguenau. Les différents haplotypes obtenus sont regroupés en fonction de leur représentation dans la population de graines étudiée.

La fréquence relative des différents haplotypes identifiés dans une descendance donnée permet d'estimer le nombre de pères pollinisateurs et le nombre efficace de pères (**Tableau IV.5**). La diversité haplotypique est élevée dans chacune des descendances observées. Le nombre estimé de pères pollinisateurs (N_h) est très élevé puisque, en moyenne, 68% des graines d'une descendance sont issues de pères différents et à contribution unique. Le nombre efficace de pères rapporté à une taille commune d'échantillonnage de 20 graines est en moyenne de 13,1 mais varie toutefois de 4,3 à 20. Si on peut noter la présence dans toutes les descendances d'haplotypes non identifiés dans la population de reproducteurs, la contribution relative de ces haplotypes varie fortement d'une descendance à l'autre. 6 d'entre eux sont présents chacun dans au moins 5 graines analysées.

2.3 Diversité génétique des descendances et caractéristiques du voisinage reproducteur

Le nombre de descendances étudiées étant limité, aucune analyse de structuration spatiale robuste des paramètres de diversité présentés ci-dessus ne pouvait être conduite. La variabilité observée pour le pourcentage d'haplotypes non identifiés dans la population de reproducteurs peut néanmoins être géoréférencée sur le site d'études (**Figure IV.2**). On rencontre les plus fortes valeurs de ce paramètre dans les situations suivantes :

- pour des arbres-mère en peuplement à forte densité de pin sylvestre (parcelle 1064) mais où l'inventaire exhaustif des reproducteurs était limité à un voisinage de 50 m. Les pères possédant l'haplotype original peuvent être présents dans un voisinage plus large mais n'ont pas été couverts par l'échantillonnage.
- pour des arbres mères en peuplement à faible ou moyenne densité (parcelles 1062, 1063) mais présents au sein de zones à inventaire exhaustif de reproducteurs. Ils témoignent de l'existence significative de flux de pollen à longue distance (> 100m).

Par ailleurs, aucune relation particulière entre le pourcentage d'haplotypes non identifiés dans la population de reproducteurs et d'autres caractéristiques des arbres mères n'a pu être mise en évidence.

Nous avons également cherché à mettre en relation la variabilité observée pour le nombre efficace de pères rapporté à 20 graines avec les différentes caractéristiques connues des arbres mères (précoce de floraison, nombre de graines pleines par cône, taux de graines pleines) et de leur voisinage reproducteur (densité locale dans un rayon de 30m). Les arbres mères dont le nombre efficace de pères rapporté à 20 graines est le plus faible (< 12) présentent des

Descendance	N	Loci haplotypique					
		Nh	Hp	% Hp	Hs	Nep	Nep20
684	28	20	8	40,0	0,954	10,3	7,4
697	18	15	5	33,3	0,926	13,5	15,0
2004-01	36	25	8	32,0	0,945	20,3	11,3
2004-02	15	14	2	14,3	0,924	13,2	17,6
2004-04	20	18	5	27,8	0,935	16,7	16,7
2004-05	38	23	7	30,4	0,940	17,6	9,3
2004-07	3	3	2	66,7	0,667	3,0	20,0
2004-08	36	30	7	23,3	0,952	24,0	13,3
2004-09	16	13	8	61,5	0,883	10,7	13,3
2004-10	35	24	7	29,2	0,945	17,3	9,9
2004-11	20	16	5	31,3	0,915	14,3	14,3
2004-14	20	16	2	12,5	0,930	13,3	13,3
2004-15	19	15	2	13,3	0,909	12,4	13,1
2004-16	14	11	3	27,3	0,898	9,8	14,0
2004-17	29	18	3	16,7	0,880	8,0	5,5
2004-20	12	10	2	20,0	0,903	9,0	15,0
2004-21	19	19	2	10,5	0,925	19,0	20,0
2004-22	14	13	2	15,4	0,918	12,3	17,5
2004-23	20	20	6	30,0	0,935	20,0	20,0
2004-24	19	15	3	20,0	0,875	12,4	13,1
2004-25	20	18	3	16,7	0,845	16,7	16,7
2004-26	37	22	2	9,1	0,928	8,4	4,5
2004-27	19	14	4	28,6	0,942	11,6	12,3
2004-28	35	25	2	8,0	0,903	12,6	7,2
2004-29	20	19	5	26,3	0,930	18,2	18,2
2004-30	20	12	4	33,3	0,915	4,3	4,3
2004-31	32	27	10	37,0	0,949	21,3	13,3
2004-32	15	10	4	40,0	0,907	7,3	9,7
2004-33	18	14	2	14,3	0,938	10,1	11,3
2004-34	33	25	6	24,0	0,948	21,4	12,9
2004-35	35	31	15	48,4	0,927	28,5	16,3

Tableau IV.5 : Distribution des haplotypes chloroplastiques dans chacune des 31 descendances maternelles récoltées à Haguenau. N, nombre de graines génotypées ; Nh : nombre total d'haplotypes identifiés ; Hp : nombre d'haplotypes non identifiés dans la population de reproducteurs ; Hs : diversité haplotypique ; Nep : nombre de pères efficaces ($1/\sum p_i^2$, avec p_i fréquence de l'haplotype dans la descendance) ; Nep20 : nombre de pères efficaces approché pour 20 graines.



Figure IV.2 : Représentation cartographique du pourcentage d'haplotypes non identifiés dans la population de reproducteurs et présents dans chacune des 31 descendances maternelles récoltées à Haguenau. La taille du cercle est proportionnelle au pourcentage d'haplotypes. Les limites de parcelles forestières figurent en trait noir (de gauche à droite, parcelles 1064, 1063, 1062). Les limites des zones inventoriées exhaustivement sont schématisées en trait orange.

densités locales de reproducteurs très variables (**Figure IV.3a**). Lorsque la taille de voisinage est inférieure à 5 arbres, on pourrait émettre l'hypothèse d'un nuage pollinique peu diversifié, résultat de la contribution d'un faible nombre de voisins. Lorsque par contre la densité locale de reproducteurs est importante (> 20), on peut supposer la contribution majoritaire de quelques pères gros producteurs de pollen. Un nombre efficace de pères élevé peut néanmoins être associé à une densité locale faible, laissant supposer l'existence d'un nuage pollinique diversifié et homogénéisé par des phénomènes aérologiques, situation hautement probable dans un massif de la taille de celui de Haguenau.

Ces mêmes arbres mères à nombre efficace de pères faible présentent des taux de graines pleines contrastés (**Figure IV.3b**). Les 4 d'entre elles cumulant faible taux de graines pleines et nombre efficace de pères limité pourraient témoigner soit d'une limitation qualitative et quantitative du nuage pollinique, soit d'un pourcentage élevé de croisements entre quelques individus fortement apparentés. Lorsque par contre le taux de graines pleines est élevé, on peut là encore supposer la contribution majoritaire de quelques pères gros producteurs de pollen.

Aucune relation particulière ne peut être mise en évidence entre nombre efficace de pères et succès reproducteur des arbres mères estimé à l'aide du nombre moyen de graines pleines par cône (**Figure IV.3c**). En situation de pollinisation non limitante (cas de massifs de grande taille), la variabilité pour la production de graines pleines peut en grande partie être attribuée à une forte variabilité individuelle pour la capacité de floraison femelle.

Les rares arbres mères à floraison femelle tardive de l'échantillonnage présentent un nombre efficace de pères inférieur à la moyenne (**Figure IV.3d**). Le fort synchronisme entre floraison mâle et femelle semble réduire les risques d'apports insuffisants en pollen aux seuls arbres extrêmes pour la gamme de phénologie de floraison observée.

2.4 Discussion

Observer une diversité génétique des nuages polliniques similaire à celle de la population de reproducteurs est un résultat courant chez les arbres forestiers (Robledo-Arnuncio et al., 2004a ; Bittencourt et Sebbenn, 2007 ; Geng et al., 2008 ; Pakkad et al., 2008). Bien que les comparaisons de diversité entre deux générations soient relativement courantes pour des marqueurs nucléaires, elles restent relativement rares pour des marqueurs chloroplastiques et sont souvent basées sur des marqueurs chloroplastiques peu polymorphes (Geng et al., 2008).

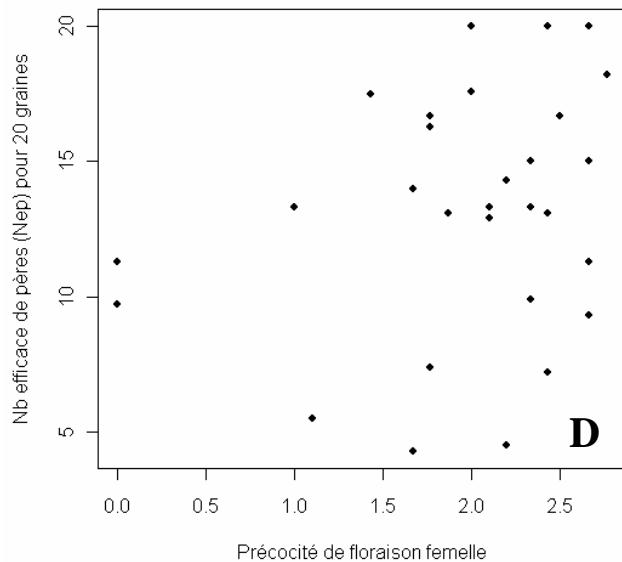
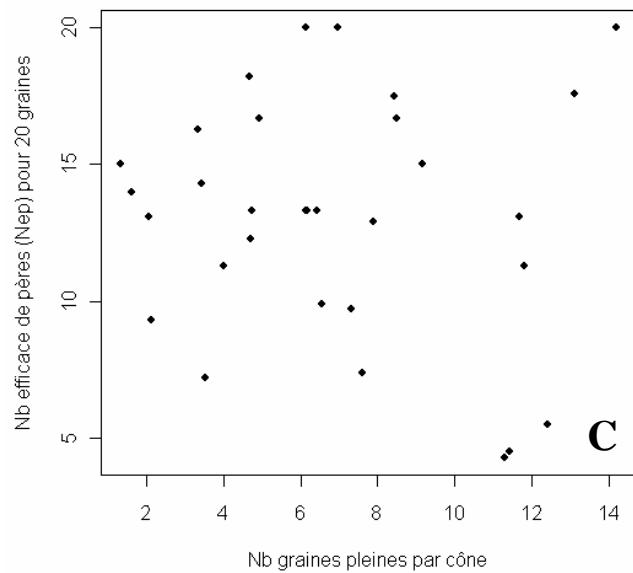
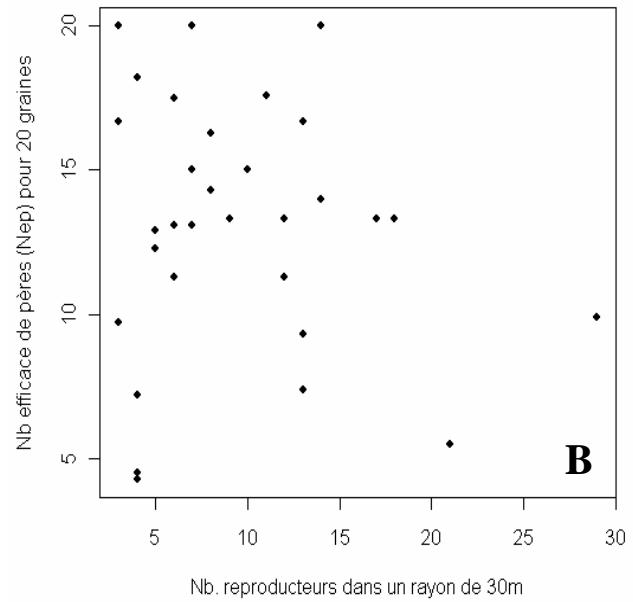
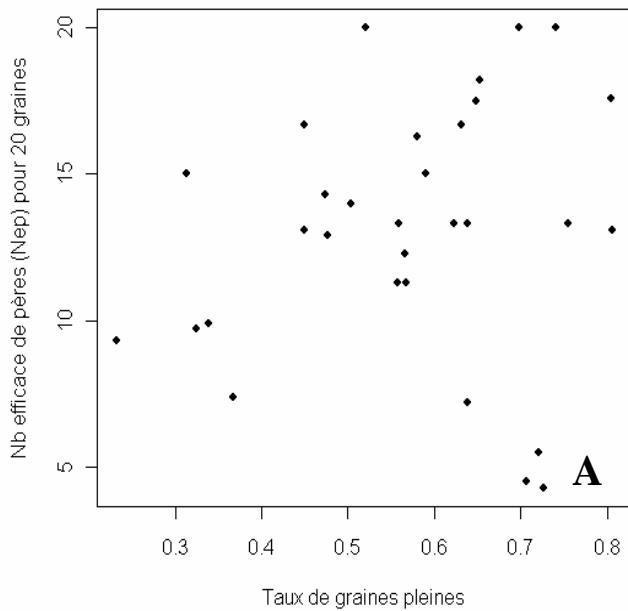


Figure IV.3 : Relations entre diversité génétique d'origine paternelle (Nep rapporté à 20 graines) et caractéristiques des arbres-mères ou de leur voisinage reproducteur : **a)** le nombre de reproducteurs dans un voisinage de 30m de l'arbre-mère, **b)** le taux de graines pleines, **c)** le nombre moyen de graines pleines par cône et **d)** la précocité moyenne de floraison femelle estimée en 2004, 2005 et 2006.

La forte diversité mesurée avec les deux types de marqueurs utilisés et l'absence de déficit en hétérozygotes peuvent être expliquées par deux caractéristiques du régime de reproduction du pin sylvestre : une fécondation essentiellement allogame et un nombre efficace de pères élevé (Muona et Harju, 1989 ; Robledo-Arnuncio et al., 2004a et b). Dans notre étude, les taux d'allogamie observés sont proches de 1 et de niveau comparable à ceux observés dans d'autres peuplements de pin sylvestre ($t_m=0,93-0,97$, Muona et Harju, 1989 ; Robledo-Arnuncio et al., 2004b) et pour d'autres espèces de conifères (voir Restoux et al., 2008 pour une synthèse). Les très faibles taux d'autofécondation observés sur graines peuvent s'expliquer chez le pin sylvestre par la forte dépression de consanguinité qui agit négativement sur le taux de survie du zygote (Karkkainen et Savolainen, 1993) et se traduit généralement par la formation de graines vides. L'estimation du taux d'autofécondation à partir de graines pleines viables conduit ainsi à une sous-estimation du niveau d'autofécondation réelle dans les populations.

Des taux d'autofécondation non négligeables ont toutefois été estimés dans certaines situations (Rajora et al., 2000 ; Xie et al., 1991 ; Robledo-Arnuncio et al., 2004b). Ils sont généralement expliqués par des tailles de population et des densités réduites de reproducteurs (Rajora et al., 2002 ; Robledo-Arnuncio et al., 2004b ; Tomita et al., 2008). Alors que Robledo-Arnuncio et al. (2004a) soulignent l'importance de la densité locale de reproducteurs sur le taux d'autofécondation en peuplement isolé, notre site d'étude en plein cœur d'un massif de pins sylvestres ne permet pas de révéler d'éventuels effets de densité locale de polliniseurs. En cœur de massif forestier, il semble donc que les productions et dispersion de pollen soient suffisamment importantes pour polliniser toutes les fleurs femelles produites et peuvent expliquer que l'effet de la densité sur le régime de reproduction ne soit pas toujours significatif (Beaulieu et Simon, 1995; Neale et Adams, 1985, mais voir Tomita et al., 2008). Des données expérimentales associées à des simulations démontrent qu'une augmentation de l'autofécondation n'est visible que dans des peuplements isolés de faible densité (20 arbres par hectare, Robledo-Arnuncio et al., 2004a) et que les variations des taux d'allofécondation entre individus sont généralement faibles chez les conifères (O'Connell et al., 2006).

Il semble intéressant de souligner que seules les situations correspondant à une limitation de la production de pollen permettent de révéler des relations significatives entre densité locale de reproducteurs d'une part et taux de graines pleines ou taux d'autofécondation d'autre part. (Cf Chapitre III ; Rajora et al., 2002).

Source de variation	d.d.l.	Variance estimée	% de variance	Φ_{FT}	p-value
Microsatellites nucléaires :					
Inter descendances	31	0,188	14	0,151	< 0,001
Intra descendances	743	1,129	86		
Total	774	1,317	100		
Haplotypes chloroplastiques :					
Inter descendances	31	85,00	2	0,025	0,235
Intra descendances	743	4590,96	98		
Total	774	4675,96	100		

Tableau IV.6 : Résultats de l'AMOVA (approche TwoGener) réalisée sur les 31 descendances maternelles de Haguenau pour 3 microsatellites nucléaires et 6 microsatellites chloroplastiques.

3. Détection de différenciations des nuages polliniques

Une éventuelle différenciation des nuages polliniques entre arbres-mères peut être attribuée soit à une dispersion du pollen limitée dans l'espace soit à une forte ‘correlated paternity’ au sein des descendances (Bittencourt et Sebbenn, 2007). Nous avons donc dans un premier temps cherché à vérifier si une telle différenciation pouvait être mise en évidence entre les nuages polliniques ayant contribué à la production des graines analysées à partir des 31 descendances maternelles récoltées à Haguenau.

3.1 Niveau de différenciation avec les deux types de marqueurs

L'estimation de la différenciation des nuages polliniques (ϕ_{FT}) obtenue par l'approche de type TwoGener (Smouse et al., 2001) a été réalisée à partir des données de génotypage à l'aide des deux types de marqueurs (chloroplastiques et nucléaires) sur 743 graines de 31 descendances maternelles (**Tableau IV.6**). L'AMOVA montre, quel que soit le type de marqueur (nucléaire, chloroplastique) utilisé, que la variance moléculaire intra-descendance représente la source de variation prépondérante. Seuls 2% (marqueurs chloroplastiques) et 14% (marqueurs nucléaires) de la variance totale observée correspondent au niveau inter-descendances. La différenciation des nuages polliniques estimée à partir des données nucléaires sur l'ensemble des arbres mères des 3 parcelles échantillonnées apparaît significative ($\phi_{FT} = 0.151, p < 0.001$). En revanche cette différenciation est faible et non significative quand elle est estimée à partir des données chloroplastiques ($\phi_{FT} = 0.025, p = 0.235$ n.s.). Les nuages polliniques qui contribuent à la production de graines des arbres-mères étudiés ne diffèrent donc pas les uns des autres avec ce type de marqueurs à hérédité paternelle. L'interprétation des résultats observés à l'aide des marqueurs nucléaires doit donc être modulée par les informations apportées par les marqueurs chloroplastiques. On peut en effet faire l'hypothèse de l'existence d'un nuage pollinique homogène à l'échelle des trois parcelles étudiées au cœur du massif forestier de Haguenau combinée à l'existence d'une structuration génétique spatiale des arbres adultes.

L'estimation de la différenciation des nuages polliniques obtenue par l'approche TwoGener (Smouse et al., 2001) varie de 0,025 pour les marqueurs chloroplastiques à 0,151 pour les marqueurs nucléaires. Pour ces derniers, la valeur observée est relativement forte par rapport aux valeurs trouvées dans la bibliographie pour les espèces anémophiles: 0,007 pour *Pinus sylvestris* (Robledo-Arnuncio et al., 2004a), 0,061 pour *Quercus alba* (Smouse et al., 2001),

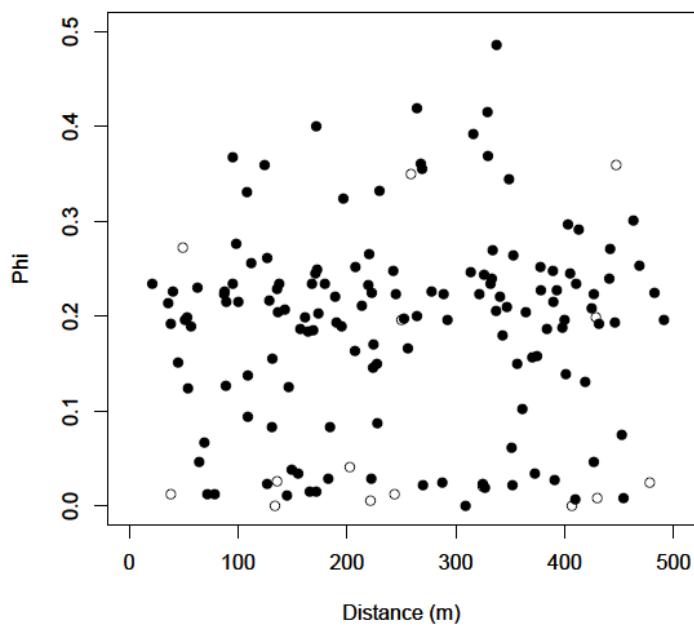


Figure IV.4 : Relation entre la différenciation des nuages polliniques (Φ_{FT}) estimée à l'aide de 3 microsatellites nucléaires et la distance entre arbres mères. Les points noirs indiquent une différenciation significative au seuil de 5%, les points blancs une différenciation non significative.

0,047-0,075 pour *Pinus echinata* (Dyer, 2002) et 0,034-0,070 pour *Quercus salicina* (Nakanishi et al., 2004). Elle est comparable à la valeur observée dans un peuplement de *Quercus lobata* de faible densité ($\phi_{FT} = 0,136$, Sork et al., 2002), et où la taille de population efficace qui en résulte est relativement faible ($N_{ep} = 3,5$). La distribution très asymétrique des fréquences alléliques du marqueur ctg 4363 (cf III.3.1) pourrait être à l'origine d'une surestimation de cette différenciation. Bien qu'à ma connaissance aucune étude sur la différenciation des nuages polliniques basée sur des marqueurs chloroplastiques ne soit disponible, il apparaît que ces marqueurs constituent des outils de choix pour l'étude des flux de pollen étant donné leur meilleure robustesse par rapport aux hypothèses sous jacentes des modèles généralement utilisés. Au niveau chloroplastique, une forte proportion de pollen issu d'immigration peut permettre d'expliquer l'absence de différenciation des nuages polliniques observés. En effet, il semble qu'en cœur de massif forestier, une faible proportion du pollen provient d'individus voisins, alors que la majorité proviendrait des peuplements alentours et peut donc être considéré comme un nuage pollinique unique (Burczyk et al., 2006). Cette hypothèse semble d'autant plus réaliste que dans notre population relativement âgée, peu d'individus sont florifères (ou fleurissent très peu) et ne sont donc pas aptes à saturer de pollen les fleurs femelles situées à proximité ('Mass Action Hypothesis', Holsinger, 1995).

3.2 Différenciation des nuages polliniques et caractéristiques des arbres mères

Nous avons cherché à mettre en relation les estimations de différenciation des nuages polliniques avec la position géographique des arbres mères les uns par rapport aux autres (distance), leurs caractéristiques de voisinage (nombre de reproducteurs dans un rayon de 30m) et leurs caractéristiques phénologiques (précocité de la floraison femelle).

Aucune corrélation significative entre distance géographique entre arbres-mères et différenciation génétique des nuages polliniques n'a pu être mise en évidence avec les marqueurs nucléaires (**Figure IV.4**). On peut en déduire que la distance entre arbres ne constitue pas la cause principale de différenciation des nuages polliniques observée avec ce type de marqueurs. Etant donnée l'absence de corrélation au niveau nucléaire entre distance géographique et différenciation polliniques et l'absence de différenciation au niveau chloroplastique, nous n'avons pu estimer une courbe de dispersion du pollen. Sous dispersion

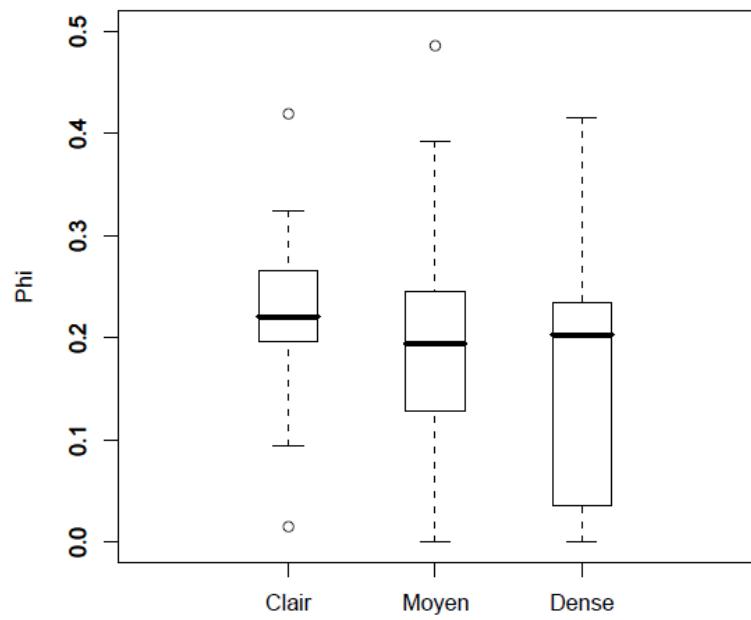


Figure IV.5 : Différenciation moyenne (Φ_{FT}) des nuages polliniques des 31 arbres mères, estimée à l'aide de 3 microsatellites nucléaires. Les arbres mères sont regroupés selon trois classes de densité moyenne de voisinage (faible, moyenne, forte).

limitée, l'on s'attend en effet que la différenciation augmente avec la distance (Nakanishi et al., 2004 ; De-Lucas et al., 2008, Robledo et al., 2008).

Afin de tester l'effet de la densité de voisinage sur la différenciation des nuages polliniques, les arbres-mères ont été regroupés selon trois classes de densité de pins représentatives des parcelles dans laquelle elles se situent : faible (parcelle 1062), moyenne (parcelle 1063), forte (parcelle 1064). Bien qu'on observe là encore une forte différenciation des nuages polliniques à l'intérieur de chacune des parcelles, on ne note en revanche pas de différence significative de différenciation moyenne des nuages polliniques entre les trois parcelles (**Figure IV.5**). Il est intéressant de souligner qu'à densité moyenne de reproducteurs croissante, la variabilité observée pour Φ_{FT} augmente vers les faibles valeurs. Cette observation pourrait traduire une plus forte homogénéisation des nuages polliniques en peuplement dense. L'absence de relation, au sein de chacune des trois classes de densité, entre distance entre arbres mères et différenciation de leurs nuages polliniques peut s'expliquer par la faible variation de la densité locale de reproducteurs à l'intérieur de chacune des classes.

Quand les arbres-mères sont regroupés selon trois classes de précocité de floraison femelle, une différenciation génétique significative des nuages polliniques peut être observée dans chacune de ces classes. On ne note en revanche pas de différence significative entre ces classes de précocité de floraison femelle ($\phi_{FT} = 0.033, p = 0.09$). Les décalages phénologiques observés entre individus ne sont pas suffisants pour que les nuages polliniques des différents arbres-mères soient différenciés. En effet, Burczyk et Prat (1997) montrent en verger à graines que les écarts de phénologie de floraison doivent être relativement forts pour faire apparaître une différence entre les paramètres du régime de reproduction et les déterminants du succès reproducteur.

3.3 Comparaison des nuages polliniques à l'aide de corrélation de paternité

En nous basant sur les approches indirectes utilisant les données aux marqueurs nucléaires (TwoGener et Kinship), nous avons pu estimer pour chaque couple de descendances, la proportion de graines qui ont un père identique ('correlated paternity', Hardy et al. 2004). Sous l'hypothèse d'une dispersion du pollen limitée dans l'espace, on s'attend à ce que cette proportion diminue lorsque la distance entre arbres-mères augmente. Il est à noter que les corrélations de paternité estimées sont, à de rares exceptions, de faible niveau, soulignant encore l'existence d'un grand nombre de pollinisateurs contribuant de façon assez homogène

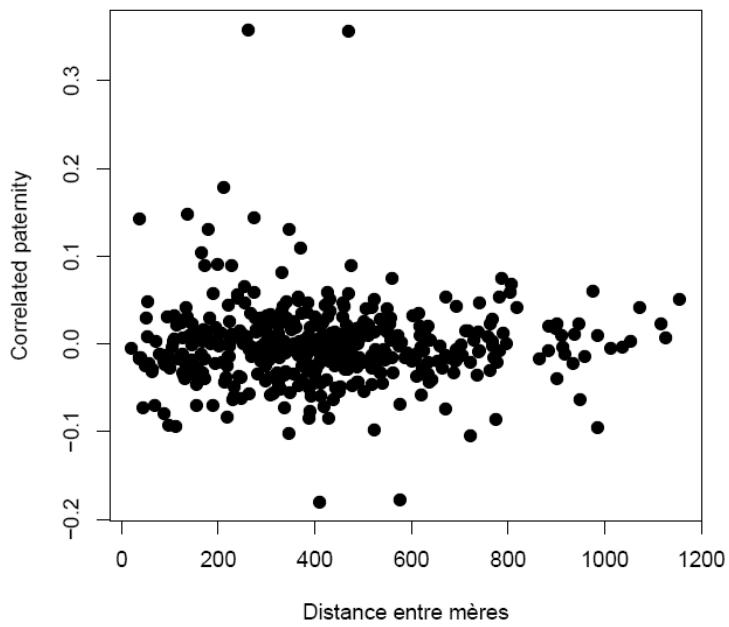


Figure IV.6 : Relation entre la corrélation de paternité (r_p) estimée entre couples de descendances maternelles et la distance géographique entre les arbres mères. L'estimation de r_p est basée sur les génotypes des descendances aux 3 microsatellites nucléaires.

Paramètres	Microsatellites nucléaires (3)	Microsatellites chloroplastiques (6)
Diversité génétique :		
Diversité H_e ou H_s	0,88	0,91
F_{is} graines	0,03 (n.s.)	-
Système de reproduction :		
Taux d'allofécondation multilocus t_m	0,97 (0,09)	-
Taux d'allofécondation monolocus t_s	0,92 (0,08)	-
Taux de croisement entre apparentés $t_m - t_s$	0,05 (0,01)	-
Proportion estimée de plein-frères multilocus $r_{p(m)}$	0,129 (0,03)	-
Nombre efficace de pères par mère $N_{ep} = 1 / r_p$	7,75	-
Approche TwoGener :		
Différentiation du nuage pollinique entre arbres mères Φ_{FT}	0,15 ***	0,025 (n.s.)
Différentiation corrigée du nuage pollinique entre arbres mères $\Phi'_{FT} = \Phi_{FT} / (1 + F_A)$	0,145	0,025
Pourcentage de variance moléculaire intra descendance	14	2
‘Correlated paternity’ $r_p = 2 \Phi'_{FT}$	0,3	0,025
Nombre efficace de pères par mère $N_{ep} = 1 / r_p$	3,3	40

Tableau IV.7 : Estimation des paramètres de diversité génétique, du système de reproduction et de différenciation des nuages polliniques à partir des 31 descendances maternelles de Haguenau. Les écart-types sont indiqués entre parenthèse. *** : $p < 0,001$; n.s. : non significatif

au nuage pollinique (**Figure IV.6**). Dans notre cas, aucune relation significative avec la distance entre arbres-mères n'a pu être mise en évidence ($r_{spearman} = 0,03$, $p\text{-value} = 0,645$).

Nous avons également cherché à mettre en évidence une éventuelle relation entre ces corrélations de paternité et les caractéristiques de floraison femelle des arbres mères ou la densité moyenne de pins selon la même démarche que celle du § 32 ci-dessus. Là encore nous n'avons observé aucune relation significative entre ces divers paramètres.

En nous appuyant sur la méthode développée par Hardy et al. (2004), nous avons estimé, pour chaque descendance maternelle, le coefficient d'apparentement moyen des gamètes mâles ayant engendré ces descendances. Le coefficient moyen d'apparentement intra descendance apparaît relativement faible ($F_{ij} = 0,0107$) mais variable d'une descendance à l'autre (de 0 à 0,065). Les différences de phénologie de floraison femelle ou de densité locale de reproducteurs n'expliquent toutefois pas les différences d'apparentement observées. En outre, nous n'avons pas pu de mettre en évidence un isolement par la distance de la dispersion du pollen à partir du coefficient d'apparentement inter-descendance basé sur l'analyse des génotypes des gamètes mâles. Aucune structure spatiale significative de l'apparentement n'a pu être détectée.

L'analyse des descendances maternelles à l'aide de marqueurs à hérédité paternelle permet d'estimer directement le nombre minimum de pères différents ayant pollinisé un arbre-mère donné. Dans les 31 descendances maternelles récoltées sur le site de Haguenau, nous avons vu que le nombre efficace de pères était très élevé et que les contributions relatives de chacun d'entre eux variaient peu. Par ailleurs, l'analyse de la répartition spatiale des polliniseurs identifiés ne montre pas de regroupement particulier autour de certains arbres-mère. Ces observations sont en adéquation avec la faible valeur de 'correlated paternity' observée dans cette étude grâce aux marqueurs chloroplastiques et plus généralement chez les conifères (**Tableau IV.7**, De-Lucas et al., 2008 ; Robledo-Arnuncio et al., 2004a). Aux loci nucléaires en revanche, la forte 'correlated paternity' observée est plus étonnante et peut être causée par l'existence d'une structure génétique spatiale (SGS) dans la population adulte (Millar et al., 2008 ; De-Lucas et al., 2008).

Le nombre de pères efficaces (N_{ep}) estimé varie de 3,3 à 40 selon les méthodes (TwoGener, mixed mating model) et types de marqueurs utilisés (**Tableau IV.7**). Ces estimations restent relativement faibles comparées aux résultats fournis par d'autres travaux sur des peuplements avec des densités moyenne à forte de reproducteurs : 83-125 chez *Pinus sylvestris* (Robledo-



Figure IV.7 : Résultats des assignations de paternité réalisées à l'aide de microsatellites nucléaires. Les zones d'échantillonnage exhaustif sont indiquées en orange. Pour chaque camembert, les couleurs indiquent la proportion de graines ayant 0 (rouge), 1 (jaune) ou au moins deux (vert) pères compatibles avec ceux échantillonnés dans les trois parcelles.

Arnuncio et al., 2004a et b), 62-143 chez *Picea glauca* (O'Connell et al., 2006), 21-56 chez *Pinus pinaster* (De-Lucas et al., 2008). Des cas de faible taille reproductrice sont cependant parfois observés dans des populations à forte densité (10-16 chez *Larix occidentalis*, El-Kassaby et Jasquish, 1996).

4. Estimation des distances de dispersion du pollen par analyse de paternité

4.1 A l'aide de microsatellites nucléaires

Parmi les 430 graines à génotype complet pour 3 microsatellites nucléaires, 76,3% ont pu être assignées à au moins un père identifié dans la population d'adultes reproducteurs et 31% (133 graines) ont pu être assignées à un seul père. Parmi ces 133 graines, 45 ont été assignées au seuil de confiance de 95% (un père assigné parmi 20 est faux) et 86 au seuil de 80% (un père assigné parmi 5 est faux). La proportion de graines sans aucun père compatible varie fortement d'une descendance à l'autre, de 0 à 0,57 (**Figure IV.7**). Ces graines sans aucun père compatible sont probablement issues d'événement de fécondation avec des pères situés au-delà des zones d'échantillonnage exhaustif de 100m. Des pourcentages élevés de graines non assignées sont observés essentiellement chez les arbres-mère à voisinage à faible densité de reproducteurs.

L'analyse de la distribution des succès reproducteurs des 75 pères de la population adulte assignés révèle qu'un très grand nombre de pères présentent des succès reproducteurs limités et que moins de 5 pères semblent avoir un succès reproducteur marqué (**Figure IV.8**). L'analyse de quelques descendances particulières montre l'importance de l'effet de la distance entre arbres père et mère sur le succès reproducteur mâle : dans les descendances des mères 2004-17, 2004-26 et 2004-34, un père situé à moins de 25m de l'arbre mère est à l'origine respectivement de 27%, 61% et 26% des graines analysées. L'avantage reproducteur de certains arbres les plus proches implique un excès de croisements aux courtes distances (Burczyk et al, 1996; Dow et Ashley, 1998; Streiff et al, 1999; Lian et al, 2001), bien que le pourcentage de graines engendrés par chaque père au sein d'un arbre mère est relativement faible (2-10%, Adams, 1992)

La distance entre arbre mère et pères compatibles identifiés varie de 6,9m à 434,6m, avec une valeur moyenne de 119,1m (écartype : 98,1m). Presque 40% des pères attribués sont situés à

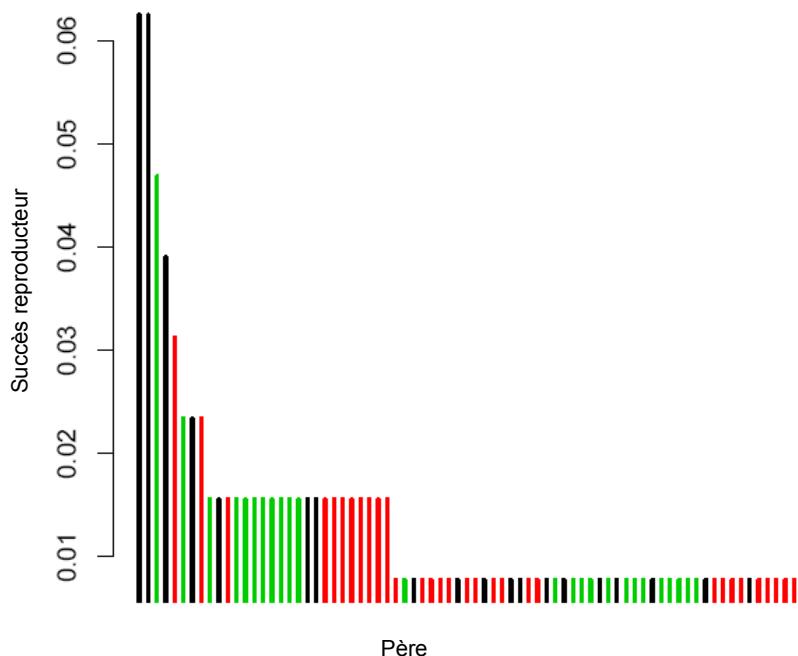


Figure IV.8 : Estimations du succès reproducteur (défini comme la proportion d'ovules fécondés) pour les 75 pères assignés sur l'ensemble des graines à partir des microsatellites nucléaires. Les barres noires représentent les pères situés en parcelle 1062 (faible densité de reproducteurs), les barres rouges les pères situés en parcelle 1063 (densité moyenne de reproducteurs) et les barres vertes les pères situés en parcelle 1064 (densité élevée de reproducteurs).

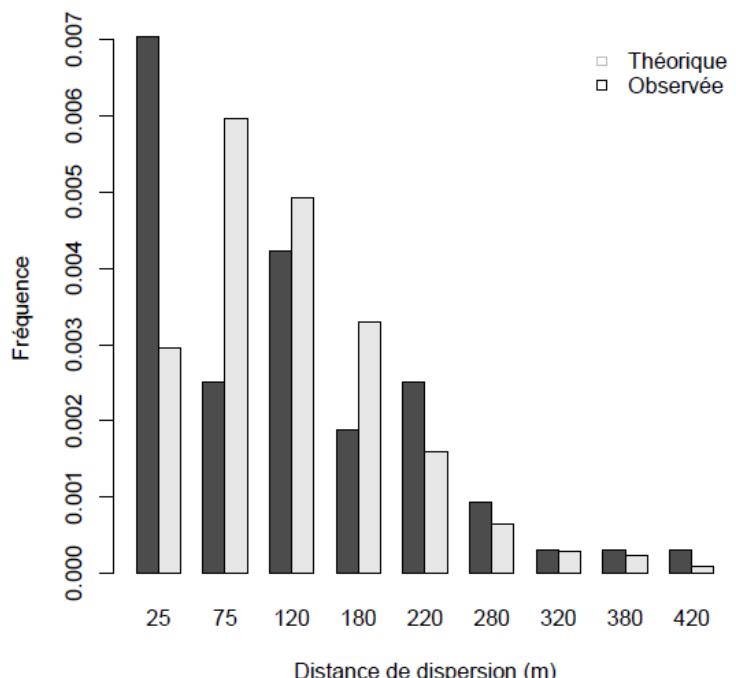


Figure IV.9 : Comparaison de la distribution potentielle (barres grises) et de la distribution observée (barres noires) entre arbres-mère et arbres pères pour l'ensemble descendances maternelles analysées à partir des données nucléaires. Le voisinage des arbres-mère a été divisé en différentes classes correspondant à des cercles de rayon variable. Pour chaque classe, le nombre d'événement de fécondation observé a été comparé au nombre d'événements potentiels (nombre d'adultes).

moins de 60m des arbres-mères concernés, et seuls 20% sont situés au-delà de 200m (**Figure IV.9**). Ces observations, avec prépondérance des événements de dispersion à courte et moyenne distances, couplées à des événements de dispersion à longue distance sont concordances avec celles observées chez le pin sylvestre (Robledo-Arnuncio et Gil, 2005). Comme chez Robledo-Arnuncio et Gil (2005) des événements de pollinisation se produisant jusqu'à 400m ont été observés en situation de faible densité.

Les cartes de dispersion efficace du pollen issues des analyses de paternité réalisées à partir des données nucléaires sont fournies en **Annexe 5**.

4.2 A l'aide de microsatellites chloroplastiques

Sur les 540 graines possédant un haplotype complet aux 6 microsatellites chloroplastiques, 121 ont pu être attribuées à un seul père par exclusion simple et 70 possédaient plusieurs pères compatibles. 349 graines (64%) n'ont pu être attribuées à aucun père de la population de reproducteurs caractérisée. La proportion de graines sans aucun père compatible dans la zone échantillonnée varie fortement d'une mère à l'autre, de 0,4 à 0,87 (**Tableau IV.8**). On notera des proportions de graines non assignées très élevées pour tous les arbres mères situées dans la parcelle 1062 à très faible densité de reproducteur **Figure IV.10**. De façon générale, la forte proportion moyenne observée sur l'ensemble des descendances souligne l'importance des flux de gènes à longue distance avec plus 60% des pères situés en dehors des zones d'échantillonnage. La distance entre un arbre-mère et un père attribué varie de 6,4m à 433,5m avec une moyenne de 103m. La moitié des pères assignés se situent à moins de 70m des arbres mères et seuls 10% se situent à plus de 200m (**Figure IV.11**).

4.3 A l'aide des deux types de marqueurs

En comparant les pères des 128 graines assignées à un seul père à l'aide des marqueurs nucléaires aux pères assignés à l'aide des marqueurs chloroplastiques, seules 12 assignations étaient totalement cohérentes sur les deux types de marqueurs et 7 autres l'étaient en utilisant 5 des 6 marqueurs chloroplastiques. Les 109 assignations restantes étaient incohérentes pour au moins deux marqueurs chloroplastiques voire même pour ces 6 marqueurs (30% des cas). Lorsqu'un seul locus était différent, la différence de taille d'allèle au niveau de ce locus était toujours de une paire de bases (motif répété) suggérant l'existence d'erreurs de génotypage.

Mère	Densité voisinage	Marqueurs nucléaires			Marqueurs chloroplastiques		
		0 père	1 père	> 1 père	0 père	1 père	> 1 père
2004-25	faible	10,0	10,0	80,0	55	12,5	32,5
2004-26	faible	37,5	32,5	30,0	77,5	15	7,5
2004-33	faible	5,3	5,3	89,5	75	2,5	22,5
2004-34	faible	35,9	38,5	25,6	77,5	10	12,5
2004-35	faible	57,5	27,5	15,0	87,5	7,5	5
2004-20	moyenne	0,0	10,0	90,0	55	15	30
2004-21	moyenne	21,4	21,4	57,1	45	15	40
2004-22	moyenne	5,9	17,6	76,5	65	15	20
2004-23	moyenne	5,9	0,0	94,1	70	12,5	17,5
2004-24	moyenne	0,0	5,9	94,1	40	20	40
2004-27	moyenne	0,0	15,8	84,2	45	15	40
2004-28	moyenne	35,9	43,6	20,5	82,5	12,5	5
2004-29	moyenne	15,0	15,0	70,0	55	17,5	27,5
2004-30	moyenne	0,0	10,0	90,0	80	10	10
2004-31	moyenne	42,5	32,5	25,0	70	27,5	2,5
2004-32	moyenne	0,0	0,0	100,0	60	15	25
2004-10	forte	2,5	47,5	50,0	50	37,5	12,5
2004-15	forte	0,0	0,0	100,0	65	5	30
2004-16	forte	0,0	8,3	91,7	50	12,5	37,5
2004-17	forte	17,5	55,0	27,5	47,5	25	27,5

Tableau IV.8 : Pourcentages de graines avec 0, 1 ou plusieurs pères compatibles avec ceux échantillonnés dans les trois parcelles étudiées pour les 20 descendances maternelles de Haguenau, selon les deux types de marqueurs microsatellites utilisés. Les descendances sont regroupées par classe de densité de voisinage (faible, moyenne, forte).

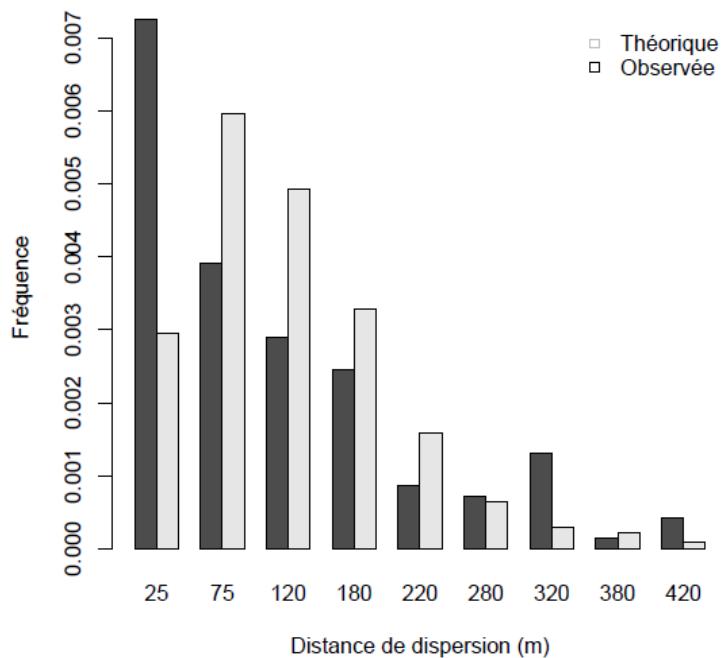


Figure IV.11 : Comparaison de la distribution potentielle (barres grises) et de la distribution observée (barres noires) entre arbres-mère et arbres pères pour les descendances maternelles analysées à partir des données haplotypiques. Le voisinage des arbres-mère a été divisé en différentes classes correspondant à des cercles de rayon variable. Pour chaque classe, le nombre d'événement de fécondation attribué par analyse de paternité a été comparé au nombre d'événements potentiels (nombre d'adultes présents).

Ces forts écarts d'assignation selon le type de marqueurs utilisés soulèvent des interrogations. La première hypothèse envisagée porte sur le taux d'erreur de génotypage relatives à chaque catégorie de marqueurs. Pour les microsatellites chloroplastiques, la séquence répétée de une paire de bases peut augmenter les erreurs non détectables de réPLICATION par la Taq polymérase, alors que des séquences de 2 ou 3 paires de base pour les marqueurs nucléaires rendent plus facilement détectables ces erreurs. Néanmoins, des mesures de taux d'erreurs ont été réalisées sur chaque type de marqueurs et n'ont pas permis de détecter des taux supérieurs à ceux observés dans les rares études les mentionnant. La deuxième hypothèse vient du très fort niveau de diversité haplotypique généré par ces microsatellites chloroplastiques. Cette très forte variabilité peut poser des problèmes dans l'estimation de la diversité génétique puisque elle nécessite d'échantillonner un très grand nombre d'individus si l'on veut avoir une bonne représentativité des haplotypes. De même les mesures de différenciation entre populations peuvent être considérablement biaisées en raison de la forte diversité, de la présence d'haplotypes rares et des forts taux d'homoplasie parfois observés chez ces marqueurs (Hedrick 1999 ; Jarne et Lagoda, 1996). L'utilisation de marqueurs chloroplastiques dans les analyses de paternité suppose donc l'utilisation de grands échantillons. Leur utilisation couplée à des marqueurs nucléaires permet de faciliter parfois des attributions de parenté (Kumar et al., 2007, Lian et al., 2008), bien que des "mismatches" soient parfois observés même au sein de croisement contrôlés (Kumar et al., 2007). En raison de leur mode d'héritage uniparental, ils constituent des outils de choix pour retracer l'histoire des populations et les conséquences de bottlenecks sur la diversité génétique des populations (Mc Cauley, 1995 ; Ennos, 1999). Leur utilisation dans les études de flux de gène contemporains est aussi d'importance puisqu'il permettent de réaliser des assignations de paternité directes (sans inférer le génotype du gamète mâle par comparaison mère-descendant), de connaître la part relative des flux de pollen et de graines et d'estimer directement le taux d'immigration (Ziegenhagen et al, 1998). Une troisième hypothèse conduit à s'interroger sur les modèles sous-jacents aux méthodes d'assignation qui pourraient être différents pour les deux types de marqueurs. L'utilisation conjointe de

5. Taux d'immigration de pollen et caractéristiques de voisinage

Le taux d'immigration de pollen estimé dans cette étude correspond à la contribution relative soit de pollen d'arbres situés dans les trois parcelles mais non génotypés, soit de pollen d'arbres situés en dehors des limites de ces trois parcelles. Il permet surtout d'estimer la part

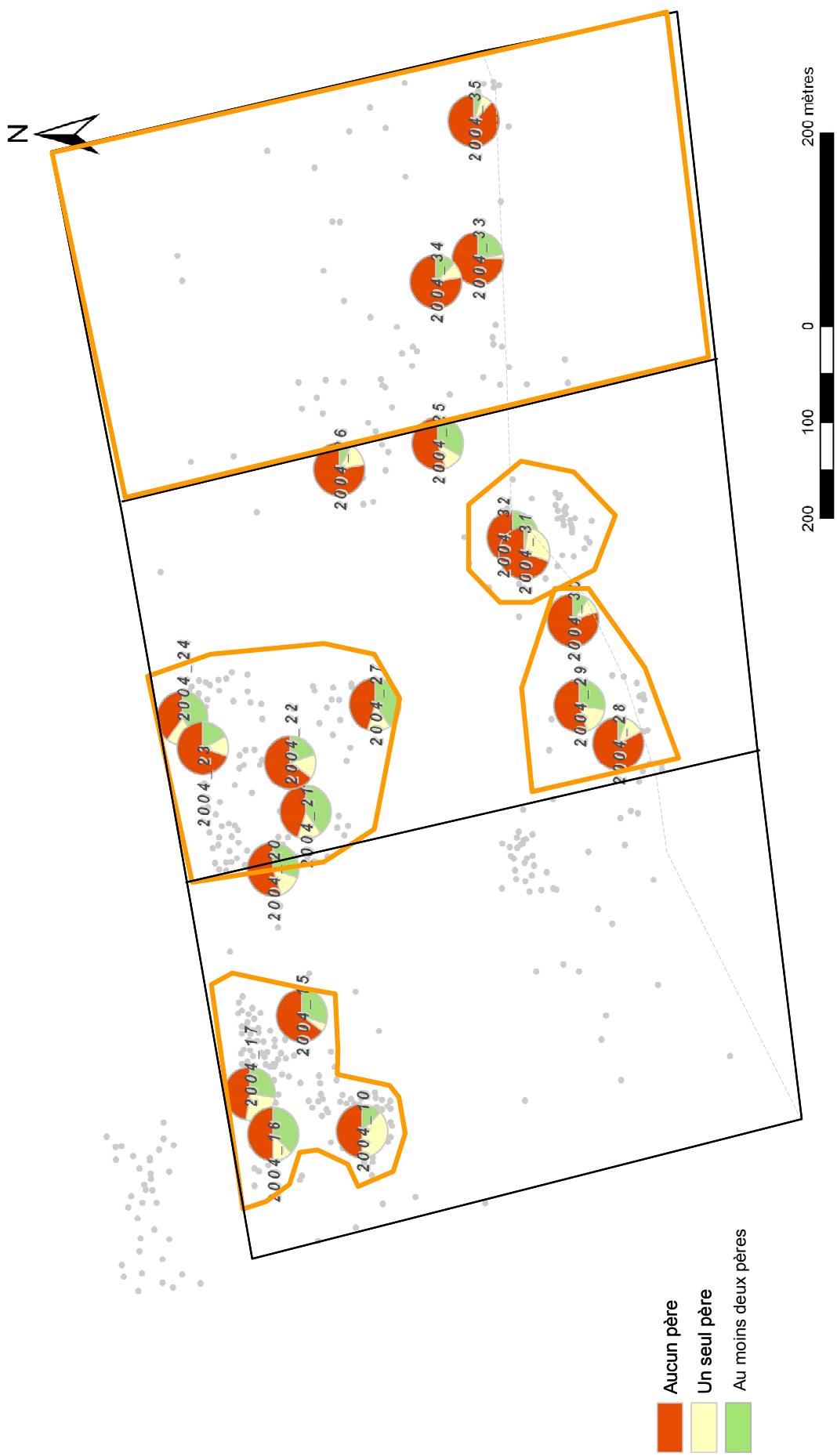


Figure IV.9 : Résultats des assignations de paternité réalisées à l'aide de microsatellites chloroplastiques. Les zones d'échantillonnage exhaustif sont délimitées en orange. Pour chaque camembert, les couleurs indiquent la proportion de graines ayant 0 (rouge), 1 (jaune) ou au moins deux (vert) pères compatibles avec ceux échantillonnés dans les trois parcelles.

d'évènement de pollinisation à des distances supérieures à 50m mais pouvant atteindre 100m et plus dans les grandes zones d'inventaire exhaustif. La comparaison des distances moyennes de dispersion de pollen observées ainsi que les taux d'immigration estimés à l'aide des microsatellites nucléaires font apparaître des différences selon les situations de voisinage des arbres-mères.

Dans les situations de faible densité moyenne de reproducteurs (parcelle 1062, 12 pins/ha), on observe un taux d'immigration moyen de 30%, pouvant atteindre 57% pour la descendance 2004-35 (**Tableau IV.8**) alors que la totalité des individus de cette parcelle a été génotypée. Les pollens migrants proviennent donc de pères situés hors des limites parcellaires, soit au moins 200m des arbres mères situés du centre de cette parcelle puisque les peuplements à l'Est de cette parcelle ne sont pas sexuellement matures. Des flux de pollen à très longue distance ont pu être mesurés sur le pin sylvestre à partir de peuplements isolés (4,5% de dispersion supérieure à 30km en situation isolée, Robledo-Arnuncio et Gil, 2005).

Lorsque la densité moyenne en pins du peuplement augmente, les taux d'immigration semblent diminuer et varient de 0 à 17% (moyenne : 5%) en situation de densité moyenne (parcelle 1063) et de 0 à 31% (moyenne : 11%) en situation de forte densité (parcelle 1064). Les différences observées pour le taux d'immigration entre ces deux types de peuplement pourraient toutefois résulter de la différence des surfaces de voisinage inventoriées exhaustivement. En effet, en zone dense (parcelle 1064), ce voisinage a été restreint aux pins situés à moins de 100m des arbres-mères alors que le voisinage en zone de densité moyenne (parcelle 1063) correspond à des distances de 200m. Quand on limite le voisinage reproducteur à une distance de 100m pour tous les arbres mères de ces deux parcelles, le taux moyen d'immigration à densité intermédiaire atteint alors 19% (en variant de 0 jusqu'à 56%). En raison des faibles effectifs en arbres mères dans les situations de forte et faible densité moyenne de pins, nous n'avons pu tester si les différences observées pour le taux d'immigration étaient significatives.

Les taux d'immigration estimés à l'aide des 6 microsatellites chloroplastiques sont nettement plus élevés que ceux estimés à partir des données nucléaires. En situation de faible densité moyenne de peuplement reproducteur, ce taux est en moyenne de 74% et peut atteindre 87%. En situation de densité moyenne ou forte, il diminue légèrement mais atteint toutefois respectivement 60% et 53%. En corrigeant les zones de voisinage à 100m pour les situations de densité moyenne, le taux d'immigration est de 76% en moyenne et peut parfois atteindre 97%.

6. Conclusion

Dans ce chapitre, les études de flux de pollen ont été conduites dans un contexte forestier présentant les particularités suivantes :

- La population de reproducteurs étudiée correspond à une ressource autochtone composée d'arbres très âgés, à niveau de floraison et fructification relativement faibles.
- Cette population est située au cœur d'un grand massif de pin sylvestre mais reste toutefois isolée d'autres parcelles de même origine génétique. Une grande majorité des parcelles voisines sont d'origine inconnue.
- Une forte variabilité pour la densité locale de reproducteurs est observée principalement entre les trois unités de gestion.

Les résultats observés confirment le régime essentiellement allogame du pin sylvestre, le taux moyen d'autofécondation estimable sur des graines viables étant très limité. Les estimations réalisées avec les marqueurs nucléaires et chloroplastiques convergent pour souligner le très haut niveau de diversité génétique des nuages polliniques captés par les arbres-mères répartis sur l'ensemble des trois parcelles. Cette diversité apparaît tout à fait comparable à celle observée dans la population d'adultes reproducteurs et ne permet pas de rejeter l'hypothèse d'un fonctionnement panmictique de cette population.

Faible différenciation des nuages polliniques et nombre efficace de pères relativement élevé avec des contributions des différents pères peu déséquilibrées s'accordent à supposer l'existence d'un important brassage du pollen dès son émission, non seulement à l'échelle de quelques arbres mais aussi à l'échelle des trois parcelles contiguës étudiées.

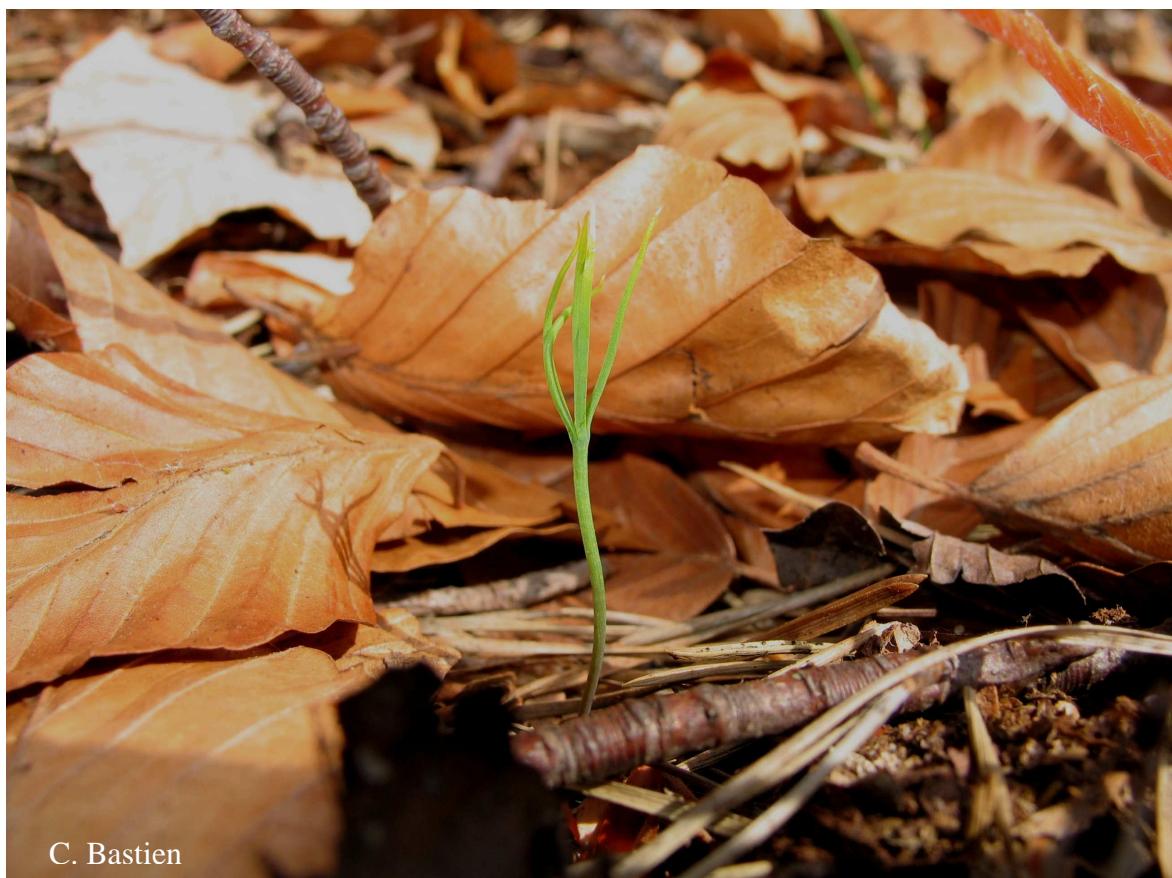
Les distances moyennes de dispersion estimées à 103m et 119m, respectivement avec les marqueurs chloroplastiques et nucléaires, se révèlent légèrement supérieures à celles estimées dans des peuplements de pin sylvestre relativement denses, présents dans des massifs de taille comparable (de l'ordre de 50m, Robledo-Arnuncio et al., 2004a). Ces distances moyennes permettent de supposer la participation significative des producteurs de pollen présents sur des unités de gestion de l'ordre de 15 à 20 ha. Ces estimations plus élevées peuvent être en partie expliquées par une limitation locale en pollen et en conséquence par une contribution plus importante de polliniseurs plus éloignés. En effet, ces arbres âgés sont souvent faiblement producteurs voire non producteurs de pollen. De plus, lorsque leur densité de voisins est faible, cette distance moyenne de pollinisation augmente significativement. Le taux élevé de non assignation de pères et la mise en évidence de contributions non

négligeables de polliniseurs situés à plus de 200m des arbres-mères montrent que la taille de l'unité de reproduction dépasse largement celle de l'unité de gestion.

Dans le contexte particulier de la ressource autochtone Haguenau, ces résultats conduisent nécessairement à s'interroger sur la pertinence du renouvellement de ce pool génétique par régénération naturelle notamment lorsque le nombre et la densité d'arbres pouvant contribuer à la reproduction sont réduits. En cas de parcelle très isolée d'autres parcelles autochtones, un nuage pollinique quantitativement suffisant assurera la production de graines mais pourrait conduire à une dilution du pool génétique autochtone (Lefèvre, 2004).

Chapitre V

*Mise en régénération du peuplement
reproducteur: de la dispersion des
graines à la diversité génétique des
semis*



C. Bastien

Chapitre V : Mise en régénération du peuplement reproducteur : de la dispersion des graines à la diversité génétique des semis

Ce chapitre de la thèse est découpé en deux sous-ensembles. Le premier est constitué d'un projet d'article sur la dispersion des graines dans le site expérimental de la forêt d'Orléans, soumis à publication dans *Forest, Ecology and Management*. Le second analyse des jeux de données complémentaires recueillis durant la thèse sur le site de Haguenau avec pour objectif d'initier une analyse génétique de la mise en place de la jeune régénération naturelle.

1. Dispersion des graines en peuplement mélangé et influence de la structure spatiale des reproducteurs sur la mise en place de la régénération naturelle

1.1 Contexte général de l'article

Les processus spatiaux sont cruciaux pour déterminer la structure et la dynamique des populations et des communautés (Tilman et Kareiva, 1997, Geritz et al., 1984; Howe and Smallwood, 1982). Parmi ces processus spatiaux, l'étude des flux de graines, couplée à des études biogéographiques, permet d'identifier les processus clés des histoires de recolonisation des espèces impliquant des événements de dispersion à longue distance (Clark, 1998). Ce processus de dispersion des graines permet de relier la fin du cycle reproducteur des adultes et l'établissement de leurs descendants. Il exerce une influence déterminante sur la répartition spatiale des individus de la génération suivante. Le patron de dispersion des graines, associé aux processus de germination, de prédation des graines et des semis et de compétition entre semis, conditionne ainsi la mise en place de la nouvelle population (Nathan et Muller-Landau, 2000). Cette nouvelle structure spatiale influencera à son tour les processus de reproduction (flux de pollen et de graines) à l'origine de la génération suivante et donc la dynamique globale de la population (Wang et Smith, 2002).

La dispersion de graines à longue distance est un évènement généralement rare dont les conséquences se font toutefois sentir sur la structuration spatiale de la diversité génétique des populations, sur la dynamique de fonctionnement en métapopulations ou sur les capacités

invasives des espèces (Debain et al., 2007). Elle contribue en outre très marginalement, du moins quantitativement, à l'installation d'une régénération naturelle lors des renouvellements de peuplements conduits dans le cadre d'une gestion forestière. En revanche, les évènements de dispersion de graines à courte distance, quantitativement plus nombreux, intéressent directement le gestionnaire forestier confronté à la mise en place d'une population conséquente de semis naturels lors de phases de régénération. En outre, bien que les flux de pollen soient à la base de la diversité génétique des graines produites, ce sont les flux de graines et le recrutement des semis qui permettent le passage d'un flux de gènes potentiel à un flux de gènes réalisé. Caractériser la dispersion des graines, et notamment les événements à courte distance, revêt donc une importance considérable pour gérer les ressources génétiques forestières au fil des générations.

1.2 Les peuplements mélangés : un contexte particulier

Les peuplements forestiers complexes, irréguliers ou mélangés, font aujourd’hui l’objet d’un intérêt croissant de la part des forestiers (Otto 1997). Cet intérêt résulte en partie d’une demande sociale pour une meilleure prise en compte de la diversité intraspécifique dans la sylviculture mais aussi de motifs sylvicoles et économiques (meilleure exploitation de certaines situations, résistance aux aléas climatiques, diversification des produits de vente permettant un lissage des revenus dans le temps). Dans les peuplements monospécifiques, où les adultes reproducteurs sont régulièrement répartis (pied à pied ou par bouquets) au sein d’une unité de gestion, la dispersion des graines n’est pas un facteur limitant pour la mise en régénération. Seule une production de graines limitée suite à un faible niveau de fructification annuelle, ou une mortalité forte lors de la germination et/ou du développement des jeunes plantules, liée à des conditions micro environnementales défavorables, peuvent conduire, une année donnée, à l’absence ou à la rareté d’apparition de semis. Dans les peuplements mélangés en revanche, les reproducteurs d’une espèce donnée peuvent être irrégulièrement répartis et en nombre parfois limité. Dans une telle situation, la taille réduite de la population source (de pollen et de graines) peut négativement affecter la production de graines et donc la population de semis. En outre, la répartition spatiale des individus, combinée à une dispersion de graines éventuellement limitée, peut potentiellement limiter l’apparition de semis naturels en tous points de la zone à régénérer. Malheureusement les données disponibles sur la mise en place d’une régénération naturelle en peuplements mélangés sont rares. Nous avons donc choisi d’étudier un peuplement mixte chênes-pin sylvestre en forêt domaniale d’Orléans afin

d'identifier les déterminants importants de la production et de la dispersion des graines de pin sylvestre susceptibles d'affecter la mise en place d'une régénération naturelle de pin.

L'origine historique des peuplements mélangés de chênes et de pins en plaine, l'évolution de leur gestion forestière et la description du site d'études en forêt d'Orléans ont été décrites au chapitre II (Matériel et Méthodes, § 1.2), nous n'y reviendrons pas.

1.3 Impacts of reproductive stand structure on spatial patterns of Scots pine seed dispersal: consequences for forest practices.

Article soumis à Forest Ecology and Management.

Abstract:

Scots pine seed dispersal pattern was investigated over two years in a mixed oak-pine plain forest with irregular spatial distribution of adult pines. The 7.5 ha plot under study was relatively isolated from other Scots pine reproductive sources. To identify how seed source-density, individual seed production and dispersal pattern could limit seed deposition, all pine trees and seed traps were geo-referenced and seed production was evaluated jointly by a cone abundance score and average filled seed yield per cone. Kinetics of seed deposition was recorded thanks to periodical harvest of 120 seed traps. Spatial distribution of seed counts and of pine reproductive characteristics were compared by Mantel autocorrelation statistics. We used an inverse modelling technique to approach the seed dispersal curve observed in 2007. Both years, a massive deposition of seeds in less than 20 days was observed before oak foliation. In agreement with evaluation of seed production at tree level, a significant difference in level of seed deposition was observed for the two successive years. Despite high variability for individual tree seed production, high conservation of tree rank between 2007 and 2008 was recorded. A significant positive relationship between local density of conspecific trees and average filled seed per cone was observed for both years. The positive and significant Mantel correlations between adults distribution and seed rain suggested a strongly leptokurtic dispersal curve with rare dispersal events over a 30-40m distance. High similarity was observed between spatial patterns of seed deposition and local seed source described by the number of pines in a 30m-radius neighbourhood. When this number exceeded five trees, the risk of no seed deposition event seemed low even for low seed

production years. The mixed composition of the studied stand did not affect Scots pine seed dispersal pattern. Dispersal distances and seed source size which combines local pine density and average seed production level were revealed as main limiting factors of seed deposition. Moreover, pollen limitation suspected in isolated mixed stands participated in limitation in seed deposition. Implications for management of natural regeneration of mixed oak-pine stands were then discussed.

Keywords: natural regeneration, seed dispersal, spatial distribution, mixed stand, *Pinus sylvestris*, tree fecundity, forest management

Introduction

In recent years, there has been an increasing interest in mixed forest stands (Götmark et al., 2005; Johansson, 2003; Otto, 1997) as a consequence of social demand for better environmental consideration in forest management and expected higher resistance to extreme climatic events or parasitic attacks (Lygis et al., 2004; Simard and Payette, 2005). Forest managers may identify added value in such kind of stands: better use of poor sites, no clear felling with resulting periods of bare soil and a better balance between costs and benefits. Moreover, forest practices have greatly changed during the last decade. This is particularly true for stand regeneration where demand for natural landscapes, multi-resource use of forests and high cost of plantations focus European forest managers attention on natural regeneration (Hougnier et al., 2006; Hyytiäinen et al., 2006).

Seed dispersal is a major process of forest population dynamics (Geritz et al., 1984; Howe and Smallwood, 1982) and information about seed dispersal and recruitment is crucial for understanding genetic structure of plant populations, species coexistence and plant invasions (reviewed in Nathan and Muller-Landau, 2000). Most of studies on seed dispersal generally focused on a description of seed dispersal curve (Gonzales-Martinez et al., 2002; Sagnard et al., 2007; Clark et al., 1999b), in order to infer for historical expansion rates (Clark, 1998), spread of species in open landscapes (Debain et al., 2007) or to calibrate mechanistic dispersal models (Nathan et al., 2001; Schurr et al., 2005). Unfortunately, these discussions on evolutive consequences of seed dispersal process have poor concrete application for current forest management and sylvicultural practices. As an example, characterization of rare long dispersal distance events is a real challenge in population dynamics studies (Nathan et al.,

2008), but is of lower interest for natural regeneration success where seed requirements are fulfilled by frequent short distance dispersal events.

Several simulation models of forest dynamics have integrated seed dispersal pattern considering that seed rain was ubiquitous (see review in Clark, 1993; Schupp and Fuentes, 1995) and that population growth rates were limited by other life stages. As heterogeneity of seed rain is now considered as a major determinant of natural regeneration dynamics (Nakashizuka, 2001), these models only provide partial understanding of it. Refined statistical methods to predict seed dispersal events (Ribbens et al., 1994; Clark et al., 1998) take in account heterogeneous seed production and thus allow analysis of its consequences on seed dispersal. Presence of seed at any spatial position depends on three constraints: seed source-density, source intensity and dispersal limitation. These constraints can be described by local density and spatial distribution of adults, individual fecundity, and seed dispersal curves (Clark et al., 1998).

Because the objective of forest managers is seedling recruitment, other constraints such as seed survival, germination success and seedling development have to be considered. Research studies dealing with determinants of natural regeneration in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) stands are abundant (Winsa, 1995; [Ruuska](#) et al., 2008; Pardos et al., 2008) but most of these studies focused on closed-canopy cases, where competition and presence of favourable micro site conditions were more important than seed dispersal limitation. Spatial distribution of reproductive trees, local seed source intensity and distance to other adult populations in the neighbourhood could be proposed as possible causes of this limitation but their implication is poorly documented.

Main objectives of the present study were (1) to investigate Scots pine seed dispersal pattern in an oak-pine stand with irregular spatial distribution of adult trees, (2) to evaluate heterogeneity of seed production at stand level and explore components of this heterogeneity for two consecutive years and (3) to propose to forest managers field descriptors of important determinants of seed dispersal for successful natural regeneration.

Material and methods

Study site

The 7.5 ha studied area, located in Orleans state forest (48°02'N, 02°12'E), is part of an adult 18 ha mixed oak-pine stand, included in a 13,550 ha continuous plain forest mostly composed of broadleaves. On these poor acid and hydromorphic soils, Scots pine has been introduced

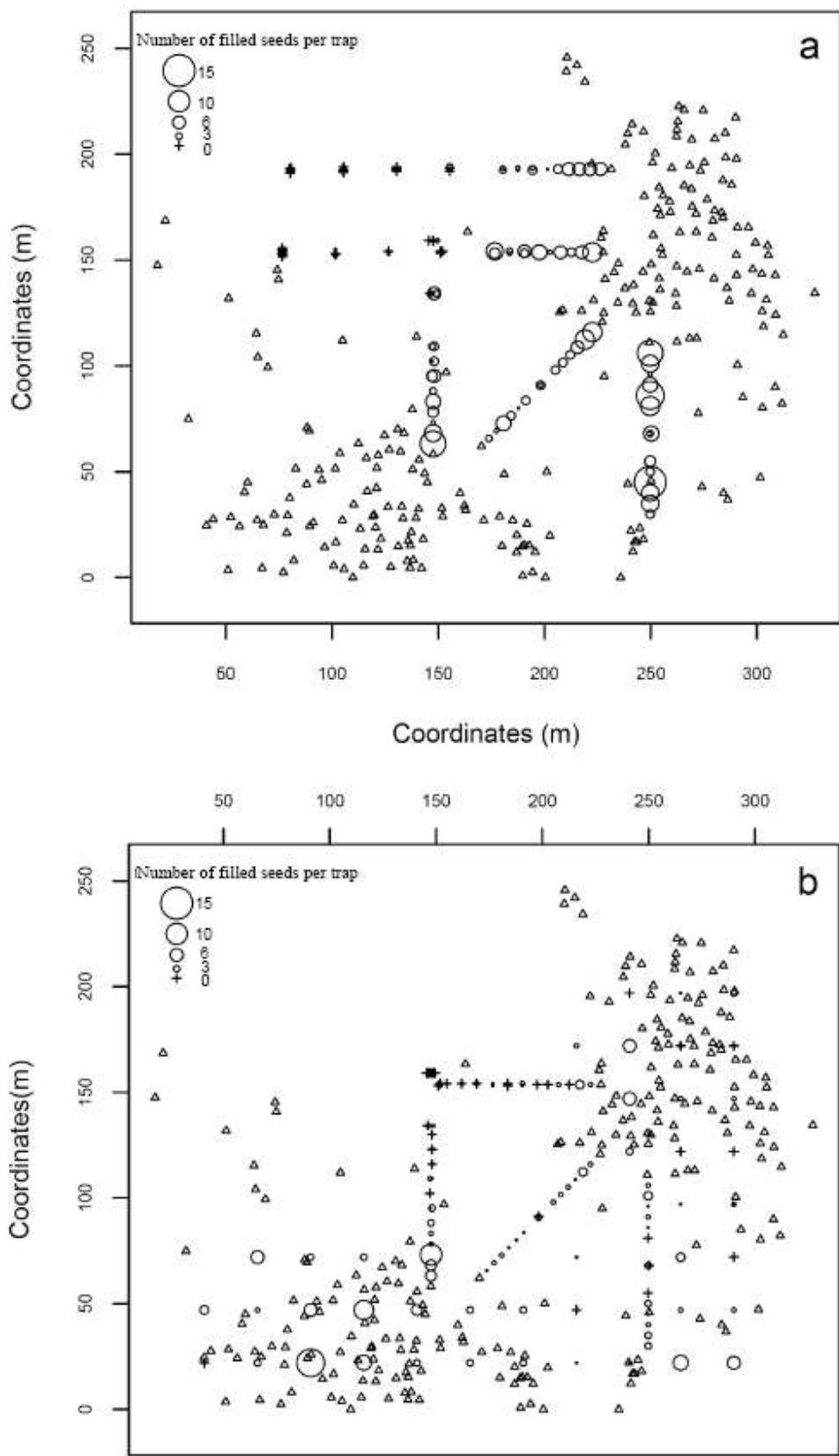


Figure 1: Map of the study area showing the position of the 234 *Pinus sylvestris* trees (triangles) and the 120 traps (circles and crosses) in 2007 (a) and 2008 (b). Circle size is proportional to the number of filled seeds trapped. Crosses indicate empty traps. Oaks are not represented.

from different geographical origins during the 19th century in oak stands gaps due to ancient overexploitation. They form aggregates with different sizes, from scattered trees to nearly one ha clumps that correspond to a second generation since the first introduction (Ngo Bieng, 2007). The studied stand was a former coppice with standards composed of a mixture of co-dominants white oaks (*Quercus sp.*) and pines associated with an hornbeam (*Carpinus betulus* L.) and aspen (*Populus tremula* L.) coppice. Dendrometric characteristics for Scots pine were the following: mean DBH = 46.5 cm, dominant height = 31 m. Sessile oak basal area varied from 2.5 to 20 m²/ha (average = 11 m²/ha) according to pine density.

Natural regeneration was under process in order to maintain an oak-pine mixture. The nearest *Pinus sylvestris* reproductive source was a 25 ha pure Scots pine stand located 500 m away from the study site. An exhaustive inventory of pines in the studied area has georeferenced 234 trees (Fig. 1). Pine spatial distribution was characterized by two dense and nearly pure zones (0.7 ha each, 105-115 trees/ha) and scattered trees in a 6 ha-zone mostly composed of oaks.

Fructification estimates

Fructifications in 2007 and 2008 have been observed by binocular on 170 trees and scaled according to 5 classes of cone abundance. Class 0 corresponds to trees without any mature cone when class 4 corresponds to trees bearing more than 2 cones per terminal shoot in average in the whole crown. All 41 scattered trees were included in the sample. In dense pine zones where observation of crown was difficult, fructifications were recorded only for trees located in a 30 m belt around each zone edge. Because pines are co-dominants with similar crown size, we considered cone abundance notation as good indicator of individual seed production. However to precise filled seed yield, we harvested each year open-pollinated progenies from 40 trees with a collection of 7 to 34 cones per tree (average = 24 cones). Thirty trees were common to 2007 and 2008 samples. Harvested trees were representative of cone abundance range and selected both in dense and scattered zones. Extraction of seeds of pooled cone lots allowed estimation of average number of filled seeds per cone and rates of filled seeds.

Seed trapping

Kinetics of seed deposition was recorded in 2007 and 2008 thanks to periodical harvest of 120 seed-traps every 5 days from early March to end of June. Data collection stopped when no more seed was observed in seed-traps during 15 consecutive days. Each trap is a cone-shaped

Variable	Description	Range	
		2007	2008
N10	Number of trees in a radius of 10m	0-2 (0)	0-6 (0)
N15	Number of trees in a radius of 15m	0-4 (0)	0-13 (1)
N20	Number of trees in a radius of 20m	0-9 (0)	0-21 (2)
N30	Number of trees in a radius of 30m	0-15 (1.5)	0-36 (5)
N50	Number of trees in a radius of 50m	0-40 (6)	2-80 (17)
Dmin	Distance to the nearest tree (m)	0.9-58 (21)	0.4-30.3 (10)
D5	Mean distance to the 5 nearest trees (m)	10.2-72.5 (35)	4.5-52 (22)
D10	Mean distance to the 10 nearest trees (m)	15.1-83.7 (43)	8.3-63.6 (28)
D15	Mean distance to the 15 nearest trees (m)	18.6-91.5 (50)	11.1-69.9 (32)
D30	Mean distance to the 30 nearest trees (m)	26.6-115 (60)	16.5-81.1 (45)

Table1: Characteristics of traps reproductive neighbourhoods. Between brackets the median value. Note the difference between 2007 and 2008 with an increase for N10 to N50 values and a decrease for Dmin to D30.

container with a 0.25 m^2 circular collecting surface, placed 10 cm above the ground level to prevent seed predation. Empty and filled seeds were counted in each (trap x date) harvest.

Spatial distributions of traps covered different objectives:

- In 2007, the 120 traps were established along 5 transects starting from dense pine zones in order to estimate long distance seed dispersal capacity of Scots pine (**Fig. 1**). In each transect, one trap was placed every 5 m until a distance of 50 m, considered as a threshold of effective seed dispersal distance for several coniferous species (Camarero et al., 2005; Ribbens et al., 1994). Then series of increasing number of traps were placed every 25 m until a distance of 150 m from the edge of pine zone. This design increased the probability to capture rare long dispersal events.
- In 2008, distribution of traps favoured evaluation of seed dispersal capacity at short and medium distance (**Fig. 1**). Sixty five traps placed until a distance of 50 m from dense pine zones, in four among five transects, were common to both years. Twelve traps completed these four 2007 transects for distances comprised between 50 m and 100 m at 5 m intervals. The additional 43 traps were organized within the two dense zones according to a $25 \times 25 \text{ m}$ grid.

Characterisation of seed-trap environments

As the study plot presents high heterogeneity in pine density, seed dispersal might reflect this spatial heterogeneity of seed source. Number of seeds collected in each trap needs to be connected to its local reproductive neighbourhood described jointly by number of trees in a given radius and average distance between these trees and the trap. Different neighbourhood sizes up to a 50 m-radius have been explored and characterized by number of trees (**Table 1**, N10 to N50). Moreover, distances to a variable number of nearest neighbours have been calculated (**Table 1**, Dmin to D30).

Spatial distribution of seedlings

Analysis of spatial distribution of one-year old seedlings (2007 germination events) was based on counts done in June in 84 square plots of 4 m^2 (four 1 m^2 -subplots) organized according to a $25 \times 25 \text{ m}$ grid. To take into account micro-environmental heterogeneity, number of seedlings was recorded at subplot level.

Spatial autocorrelation analysis

Analysis of autocorrelation for seed trap neighbourhood characteristics and for seed counts was based on Mantel statistic r_m (Mantel, 1967; Legendre and Legendre, 1998), which

measures the linear relationship between two dissimilarity matrices. Significance of absence of correlation between the two dissimilarity matrices was tested by a 10,000-permutation test. A multivariate Mantel correlogram (Oden and Sokal, 1986) illustrated the observed pattern of autocorrelation along seven distance classes with balanced effectives of trap pairs (see Legendre and Legendre, 1998 for details). We performed also partial Mantel tests (Smouse et al., 1986) to confirm spatial autocorrelation for seed counts when neighbourhood characteristics have been held constant.

Spatial autocorrelation for seedling counts was tested by Mantel method mentioned above in 1000 datasets obtained by random re-sampling of one subplot among the four available at each point in the 25 x 25 m grid. We concluded to the presence of spatial autocorrelation in seedling counts when more than 95 % of the data sets showed significant spatial autocorrelation at $\alpha = 0.05$ level.

All spatial analyses were done using R 2.8.1 (R Development Core Team 2008) with packages ‘ecodist’ (Goslee and Urban, 2007) and ‘vegan’ (Oksanen et al., 2008).

Inverse modelling of seed dispersal curve

As it seems impossible to unequivocally match dispersed seeds to maternal source trees, we used an inverse modelling technique which simultaneously estimates fecundity and dispersal parameters without the direct observation of individual tree seed production (Ribbens et al., 1994; Clark et al., 1998; Jones and Muller-Landau, 2008). The expected seed deposition in any trap is calculated as the sum of contributions from every conspecific adult tree within the study site. Each tree’s contribution is determined by its distance from the trap and its fecundity. Thus, the expected seed rain into a 0.25 m²-trap is :

$$\hat{S}_i = \sum_j Q_j * f(r_{ij}) * 0.25$$

where r_{ij} represents the distance between the trap i and the tree j , Q_j the fecundity of the tree j and f a dispersal kernel defined as the probability of seed arrival at distance r_{ij} .

Fecundity (Q_j), *i.e* the number of seeds dispersed from the j -th tree, was assumed to be an exponential function of its cone abundance score (G_j) and number of neighbours (E_j) in a 50 m radius:

$$Q_j = \exp(b + b_0 E_j) G_j$$

Tree basal area, classically used in fecundity models (Camarero et al., 2005; Clark et al., 1999b) was of no interest in this study because of non significant correlation between cone

Year of study	2007	2008
First dispersal event	5 th April	2 nd April
Last dispersal event	3 rd June	30 th May
Time (days) to trap 75% of filled seeds	11	17
Time (days) to trap 90% of filled seeds	30	35
Total number of filled seeds trapped	372	236
Total number of empty seeds trapped	233	203
Minimal number of filled seeds per trap	0	0
Maximal number of filled seeds per trap	15	13

Table 2: Timing and intensity of seed fall observed in 2007 and 2008

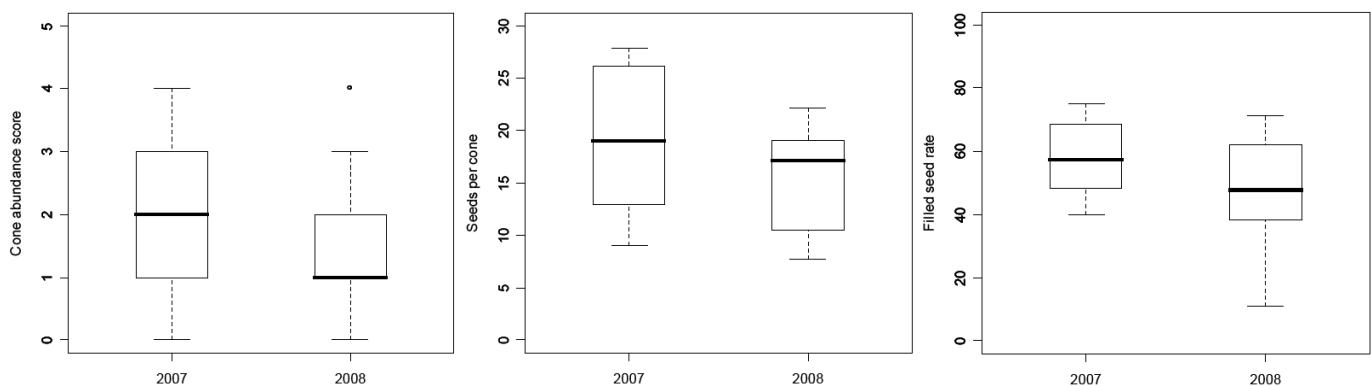


Figure 2: Seed production observed at tree level in 2007 and 2008 : cone abundance score (scale 0 to 5), number of seeds per cone, rate of filled seeds per cone (%). The dark line in boxes represents the mean value.

production and tree diameter. Number of neighbours was included as it is known to impact tree seed production (Robledo-Arnuncio et al., 2004; Schurr et al., 2008).

Following the recommendations of Canham and Uriate (2006), we compared four alternative dispersal kernels, each of which describes a two-dimensional probability density as a function of dispersal distance r with scale parameter u and shape parameter p . The exponential power kernel (Ribbens et al., 1994; Clark et al., 1998), the 2Dt distribution (Clark et al., 1999b) and the bivariate log-normal kernel (Stoyan and Wagner, 2001) are the most frequently used dispersal kernel in inverse modelling and forest seed dispersal studies. We also tested fitting quality of the WALD kernel, a simplification of mechanistic model for seed dispersal by wind (Katul et al., 2005). The likelihood of the data showing S_i seeds arriving in trap i for all traps

combined is then $\prod_i \Pr(S_i \mid \hat{S}_i)$, using a Poisson distribution of errors.

The model which maximized the likelihood was retained as the best model. All simulations were done using R 2.8.1 (R Development Core Team 2008) with a modification of the code published by Schurr et al. (2008).

Results

Time-scaling of the dispersal event and characteristics of seed deposition at stand level

In 2007 and 2008, the first seed dispersal event was observed in early April (Table 2). The duration of seed deposition process was approximately two months (60 days in 2007 and 58 days in 2008). This process could be split in two contrasted successive phases: a massive deposition of at least 75 % of seeds in less than 20 days followed by deposition of the remaining 25 % along a twice longer period (Table 2). No difference was observed between filled and empty seed dispersal kinetics. For both years, oaks foliation occurred when more than 80 % of pine seeds were dispersed, suggesting that oaks had little influence on pine seed dispersal patterns.

Level of seed deposition differed among studied years, with 605 seeds trapped in 2007 and 439 in 2008. For the 65 traps common to both years this decrease was confirmed and significant rank correlation was observed between filled seeds trapped the two years ($\rho = 0.40$, p -value < 0.01). For both years, the number of filled seeds varied substantially among traps (Fig.1). Among the 26 traps located at more than 100m from the edge of the nearest dense zone, 13 were empty and 11 had only one seed. The maximum number of seeds

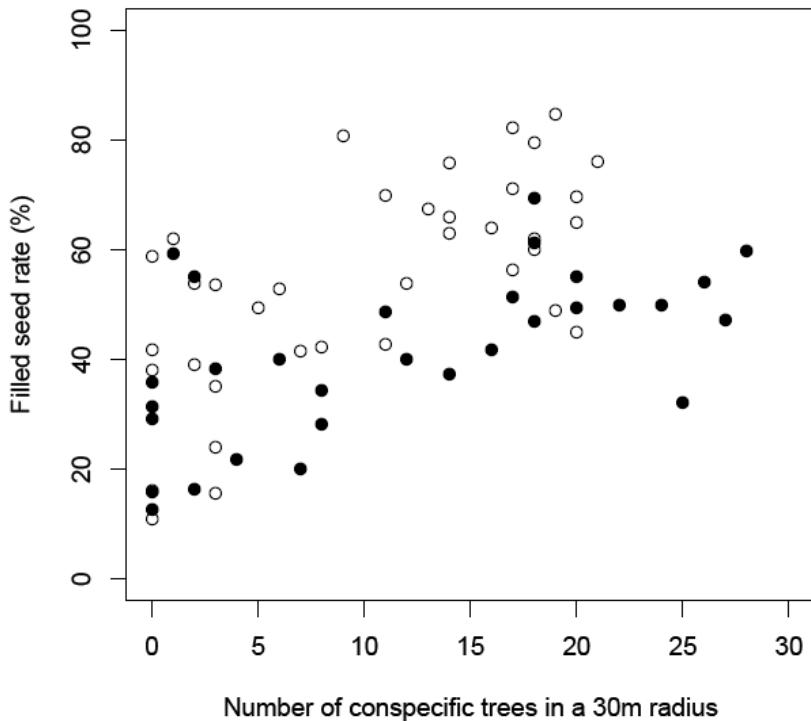


Figure 3: Relationship between local density of pines around trees collected in 2007 (white circles) and 2008 (solid circles) and rate of filled seeds in corresponding progenies. Pearson correlations were respectively 0.68 (p-value<0.001) and 0.55 (p-value<0.001) for 2007 and 2008

	Dmin	D5	D15	N15	N30	N50
Geographical 2007	0.258*** [21]	0.341*** [35]	0.346*** [43]	0.129*** [0]	0.24*** [1.5]	0.239*** [6]
Geographical 2008	0.04 (n.s) [10]	0.143*** [22]	0.133*** [28]	0.239*** [1]	0.249*** [5]	0.217*** [17]
Filled seeds 2007	0.132**	0.307***	0.41***	0.273***	0.434***	0.39***
Filled seeds 2008	0.018 (n.s)	0.09*	0.106**	0.18**	0.3***	0.27***

Table3: Mantel correlations coefficients (r) for distance matrices pair comparisons (n.s, not significant). Distance matrices are calculated for geographical position, characteristics of reproductive neighbourhood and filled seed abundance for 2007 and 2008. The values between square brackets indicate the median value of reproductive neighbourhood characteristics.

harvested in a trap was 13 in 2008 and 15 in 2007, suggesting a maximum seed rain of 52-60 seeds/m². The rate of cumulated empty seeds per trap was quite constant between years, reaching 38.5 % in 2007 and 46.2 % in 2008.

Components of seed production variability at tree level

Seed production was evaluated at individual tree level thanks to three complementary descriptors: cone abundance, average number of seeds per cone and average rate of filled seeds per cone. Significant difference between average annual performances was observed only for cone abundance (Wilcoxon test, p.value < 0.001). However for all the descriptors variation at tree level was very high but contrasted between years (**Fig. 2**). In 2007 the higher variability for cone abundance and average number of seeds per cone was explained by more trees with high individual performances. Moreover in 2008 variation of rate of filled seeds per cone increased because of significant number of trees with very low performance. High conservation of tree rank was recorded for the three components of seed production: cone abundance ($\rho = 0.35$, p-value < 0.01), average number of seeds per cone ($\rho = 0.46$, p-value < 0.01) and rate of filled seeds per cone ($\rho = 0.69$, p-value < 0.001). For both years, we observed a significant positive relationship at tree level between local density of conspecific trees and average rate of filled seed per cone (**Fig. 3**). Thus, a tree surrounded by a high number of neighbours tended to produce more filled seeds than an isolated one.

Spatial autocorrelation of seed deposition

The geographical distances between two traps and the dissimilarity of their respective neighbourhood characteristics showed significant positive spatial autocorrelation (**Table 3**), validating that established transects reflected gradients for seed source size. In 2007, spatial distribution of traps explored mainly variation for distance to seed source (D5 to D30) when in 2008, the new distribution of traps outlined contrasts of seed source size (N10 to N50) between dense pine zones and zones mostly composed of oaks.

The dissimilarity of number of filled seeds collected in two different traps and geographical distances between these two traps were significantly correlated for both years ($r_m = 0.30$, p-value < 0.01 and $r_m = 0.22$, p-value < 0.001, for 2007 and 2008 respectively), indicating that level of seed deposition showed a significant spatial structure. In 2008, no significant spatial autocorrelation ($r_m = -0.02$, n.s.) was detected when the analysis was restricted to the 43 traps distributed in dense pine zones. The corresponding Mantel correlograms (**Fig. 4**) indicated positive spatial autocorrelations among the smallest distance classes and negative

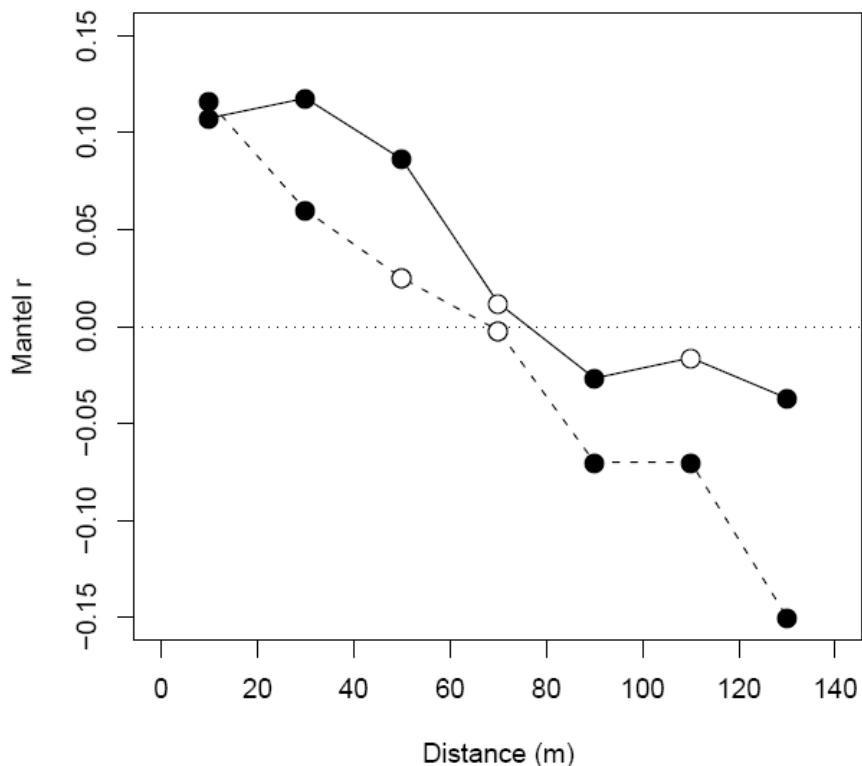


Figure 4: Mantel correlograms for spatial autocorrelation in filled seed abundance in 2007 (solid line) and 2008 (dashed line). Dark circles indicate correlation between abundance dissimilarity and geographical distance, significant at $\alpha = 0.05$ level.

Cross-matrix comparison	Controlled effect	Year	
		2007	2008
Seed abundance vs. Geographical	D15	0.16***	0.13***
Seed abundance vs. Geographical	N30	0.12***	0.11(n.s)

Table 4: Partial Mantel correlations (r_m) for cross-matrix comparisons when effects of D15 and N30 are controlled (n.s, not significant).

autocorrelation among the largest classes. High similarity of filled seed counts was observed for traps 30 m to 50 m apart. On the opposite, filled seed counts showed significant dissimilarities when distance between traps exceeded 80 m. Empty seed deposition exhibited a similar spatial pattern to filled seed deposition, thus further analyses have focused on filled seed deposition which determines natural regeneration success.

Correlations between dissimilarities calculated respectively on filled seed counts and trap neighbourhood characteristics varied with the size of neighbourhood (**Table 3**). For both years, highest similarity between spatial patterns of seed deposition and numbers of pines in a given radius (N5 to N50) was observed for neighbourhoods over 30 m-radius. Such neighbourhoods corresponded to multiple tree seed sources when neighbourhood defined by lower radius were most often limited to 0 to one single tree. Similarity between spatial patterns of seed deposition and average distance to a given number of trees (Dmin to D30) reached about the same level of 0.3 only in 2007 when average distance to the seed sources was over 30 m. When the effect of spatial pattern of neighbourhood characteristics (D15 and N30) was controlled, partial Mantel correlations between filled seed deposition and distance between traps similarities decreased strongly (**Table 4**).

Seed dispersal pattern and its relationship with neighbourhood characteristics

Inverse modelling approach was conducted only for 2007 seed deposition as 2008 was a poor seed production year with 30% of traps with no filled seed. No significant difference for quality of fit was observed between the four tested models (likelihood range from -219.6 to -225.8; r^2 range from 0.59 to 0.61), as suspected from Greene and Calogeropoulos (2002). As mechanistic models for wind dispersed propagules demonstrate best fit for LogNormal model (Greene and Johnson, 1989), effect of varying number of trees in a 30 m-radius neighbourhood on seed dispersal pattern was illustrated using this dispersal kernel and three pine density values representative of the range observed in the stand (**Fig. 5**). Even with same cone abundance score, individual trees surrounded by different amount of conspecific neighbours could disperse different amount of seeds. Moreover even in most favourable seed production scenarios, dispersal events became too rare over 30-40 m to allow natural regeneration success.

Filled seeds counts in the 65 traps common to both years were significantly correlated to local reproductive neighbourhood described either by N30 (**Fig. 6**) or D15 (Spearman rank

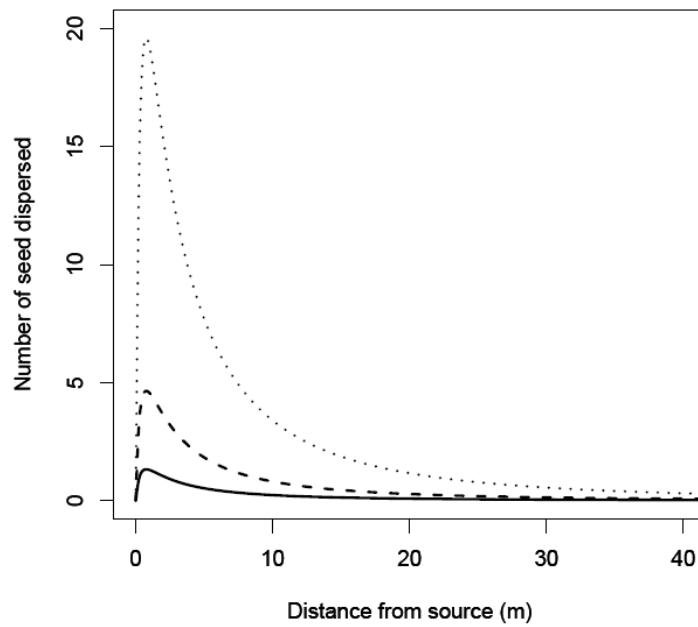


Figure 5: Individual seed dispersal pattern predicted by LogNormal inverse model. Three different 30 m-radius neighbourhoods are compared: low pine density (5 trees, solid line), median pine density (12 trees, dashed line) and high pine density (20 trees, dotted line).

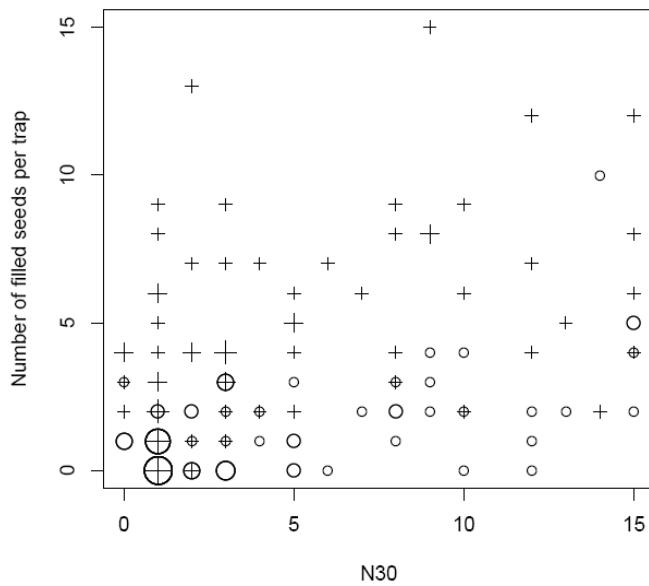


Figure 6: Relationship between the number of filled seeds trapped and reproductive neighbourhood characteristics for the 65 common traps in 2007 (cross) and 2008 (white circles). For each year, size of symbols reflects number of overlapping observations. Spearman rank correlations were respectively 0.44 (p-value < 0.001) and 0.46 (p-value < 0.001) for 2007 and 2008

correlation: $\rho = -0.65$, $p\text{-value} < 0.001$ for 2007; $\rho = -0.61$, $p\text{-value} < 0.01$ for 2008). These relationships also reflected annual variation in seed production. Annual difference in filled seeds counts was particularly clear when the number of trees in a 30 m-radius exceeded five. Under this threshold, high individual variation for cone abundance and anisotropic dispersal process could strongly affect observed seed deposition, especially for favourable seed production years. Moreover trap neighbourhoods which exceed five trees seemed to minimize the risk of empty trap events even for low seed production years.

Spatial distribution of seedlings

In 2007 number of seedlings observed per square meter (subplot) ranged from 0 to 25 with 8.5 % of plots without any seedling. Plots with high density of seedlings were concentrated under and at vicinity of the two dense pine zones (**Fig. 7**). Seedling abundance showed a clear spatial autocorrelation (average $r_m = 0.15$, $p\text{-value} < 0.01$) with positive correlation among the smallest distance classes until 50 m. Seedlings counts at trap position were generally lower than seed counts even if in controlled conditions germination rate were higher than 90 % for the different progeny lots collected in the study site (data not shown). Moreover number of seedlings varied greatly for even high number of seeds because of micro environmental variations.

Discussion

Scots pine seed dispersal pattern in a mixed stand

Temporal pattern of seed fall in a Scots pine – oak mixed stand at low elevation confirms massive deposition in a short period observed in Scandinavian pure stands (Hannerz et al., 2002). Date of first dispersal events seems to be determined by maximum daily temperatures exceeding 15-20 °C (Hannerz et al., 2002; Kerr et al., 2008) when duration of seed deposition process is correlated both to rainfall events and cumulative daily temperatures as suggested by climatic data collected near our study site. As determinants of seed dispersal phenology, variation in climatic conditions can explain observed variations among sites and years: from March to May, with massive deposition occurring along few (3 to 4) weeks (Hannerz et al., 2002).

In our study, the positive and significant Mantel correlations between adults distribution variables and seed rain suggest a strongly leptokurtic dispersal curve with few dispersal events at long distance (Clark et al., 1998). This pattern is currently observed in wind-dispersed conifer species with a mean dispersal distance generally ranking from 10 to 50 m:

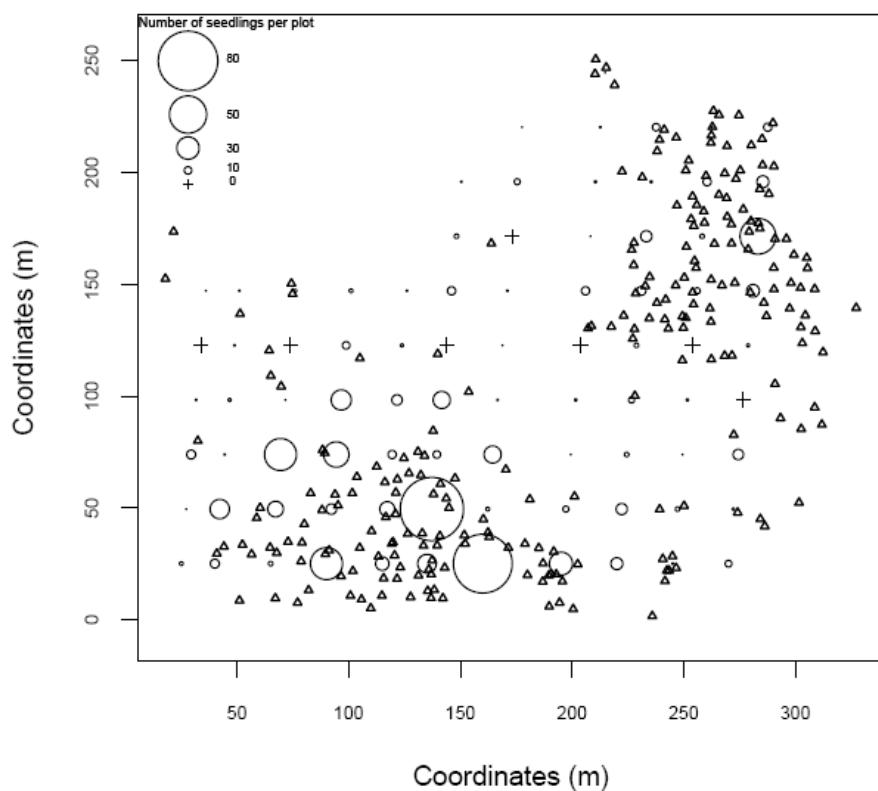


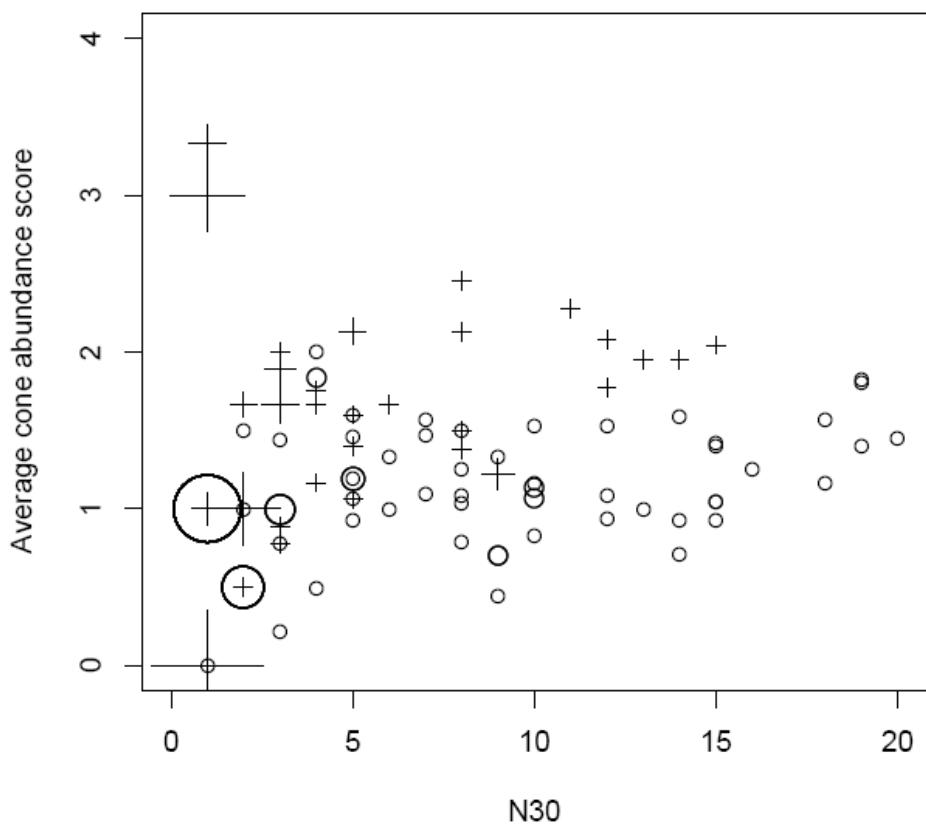
Figure 7: Map of the study area showing the position of the 234 *Pinus sylvestris* trees (triangles) and the 84 seedling 4 m² plots (circles and crosses). Circle size is proportional to the number of seedlings counted. Crosses indicate absence of seedling.

Pinus sylvestris L. (Guillet and Laberche, 1974), *Abies alba* Mill. (Sagnard et al., 2007), *Pinus rigida* Mill. (Clark et al., 1998), *Pinus halepensis* Mill. (Nathan et al., 2000), *Pinus strobus* L. (Ribbens et al., 1994). Despite perturbation of seedling development by micro-environmental variations and secondary dispersers, observed seedling spatial distribution reflects the sum of contribution of individual trees to seed dispersal. As in our study, seed dispersal distance estimated either by seed trapping or analysis of seedling spatial distribution meet similar 10-15 m range for most frequent dispersal distance (Gonzales-Martinez et al., 2002; Yazdani et al., 1989). Moreover, the mixed composition of the studied stand did not affect seed dispersal pattern probably as seed release occurred before oak foliation. Absence of physical barrier to seed dispersal in mixed stands needs confirmation with other Scots pine accompanying species such as silver fir (*Abies alba* Mill.) or Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.).

Sources of seed dispersal limitation in a patchy-structured pine-oak forest

For pioneer species such as Scots pine, seed production is a crucial aspect of population dynamics. Reproductive capacity at stand level is often estimated through cone abundance observations (Karlsson, 2000; Goubitz et al., 2004; Debain et al., 2003) and rarely precised by filled seed yield which more closely determines potential of natural regeneration (Debain et al., 2007; Hilli et al., 2008). In our study the observed average rate of filled seeds per cone was rather low (55 % in 2007 and 58 % in 2008) and similar to those observed in another partially isolated mixed stand located in the same forest (60 %, data not shown). Moreover this rate proved to be sensitive to local pine density with value decreasing up to 20 % in low density pine zone (Fig. 3). Observed values of rate of filled seeds per cone are generally higher in large and pure Scots pine stands growing in favourable ecological conditions, varying from 68 % to 98 % (Palowski, 2000; Castro et al., 1999; Karlsson and Örlander, 2000). These results suggest that in a stand located within a huge pine forest, pollen production is large enough to saturate female strobili. Lower values observed in isolated mixed stand can express combined effects of higher selfing rates (Karkkainen and Savolainen, 1993; Robledo-Arnuncio et al., 2004) and pollen limitation (Sarvas, 1962).

Comparison of spatial structure at stand level for both adult pines and seed abundance in traps illustrated the importance of reproductive trees distribution in seeds and seedlings recruitment (Table 3). Counts of seeds trapped and seedlings at a given point were mostly influenced by their vicinity to the two dense pine zones (Fig. 1). This study was not designed to measure the amount of annual seed fall at stand level. However the maximum (52-60 seeds/m²) and



Supplemental Figure 1: Relationship between 2007 (cross) and 2008 (circle) average cone abundance score observed in a 30m-radius pine neighbourhood of each seed trap and the size of this pine neighbourhood expressed in number of adult pines. For each year, size of symbols reflects number of overlapping observations.

average seed rain (12 seeds/m²) observed in these dense zones (105-115 trees/ha) are in good agreement with those observed in pure *Pinus sylvestris* stands (60-84 trees/ha) in central Sweden ranking from 2 to 63 seeds per square meter (Karlsson and Örlander, 2000). Moreover dense pine zones are characterized by an homogeneous tree distribution, lack of spatial structure in tree cone production and in seed deposition. As a consequence, seed source intensity at any given point could be considered as homogeneous and defined as the average seed production of a minimum of 5 neighbouring trees (**supplemental Figure1**). In such dense adult zones, possible origin of seed limitation can be found in stand age and annual variation for seed production such as in 2008 in our study (Karlsson and Örlander, 2000; Hilli et al., 2008).

For low pine density zones characterized by a 30 m-radius neighbourhood size below 5 trees, risk of low seed deposition event (0 or 1 seed per trap) became too high to allow natural regeneration success for a given year (2007: 54 %; 2008: 77 %). Because of the strong annual variability of such rare dispersal events, the time required to reach a sufficient amount of seedlings in low dense pine zones will be probably incompatible with management strategies (Greene and Johnson, 1995; Nathan et al., 2000). Seed source sizes and dispersal distances are cited as main limiting factors of seed deposition (Clark et al., 1999a). Considering neighbourhoods composed of less than 5 adult trees, gaps between few individual seed rains are expected due to short seed dispersal distance. Resulting fine scale genetic structures of seedlings have been reported for different wind-dispersed conifers (Scotti et al., 2008; Gonzalez-Martinez et al., 2002). Moreover high individual variability for components of seed production (Debain et al., 2003) and reduced possibility to buffer it at low tree density would affect both average and variation of local seed source size. This inter-annual variability of Scots pine seed production can be attributed both to climatic and maternal determinants and their interactions (McNeil, 1954). Cone and seed production capacities are known to be under strong genetic control (Prescher et al., 2007). Difference between good and bad seed producers tends to increase for favourable years to seed crop (Debain et al., 2003). Limitation in local seed source size could not be balanced by significant contribution from dense pine zones when these zones are located at a distance over 50-60 m (Fig. 1). These original results correspond to a case study representative of only one of the four classes defined for the mixed oak-pine stands of Orleans plain forest area (Ngo Bieng et al., 2006). Few references document the evaluation of impact of pine spatial distribution on seedling recruitment in

mixed stands (Paluch and Bartkowicz, 2004) and this subject would require further detailed investigation with different oak-pine mixture scenarios.

Implication of seed dispersal determinants for current management of mixed stands

The present study has identified several main determinants of seed dispersal for successful natural regeneration in mixed oak-pine stands. As managing mixed stands is poorly documented as compared to monoculture knowledge (Agestam et al., 2005), field descriptors of seed dispersal determinants are needed to help current management along a silvicultural cycle.

Level of seed pool quantitatively impacts the success of natural regeneration. For a given management unit, weak relative contribution of neighbouring pine management units is expected because of limited seed dispersal capacity. Significant seed immigration is limited to a nearly 50 m belt and its relative importance depends on size and shape of the stand to regenerate. Within a given unit, seed production may be reduced by pollen limitation, especially for isolated stands which do not benefit from significant external pollen contributions. Within forests composed of mosaics of stands from different origins, low quantitative external gene contribution from pollen or seeds can however have high genetic consequences on target gene pool (see review in Lefevre, 2004) .

Within an isolated stand, individual seed production capacity is influenced by local neighbourhood. Because of high individual variability in seed production capacity, natural regeneration should be avoided in mixed stands where pines are only represented by scattered trees. In such stands, the only way to maintain at stand level a mixture of species for the next generation should be to plant or to sow extra pine material. On the other hand, when pines have a clumped spatial structure with an homogeneous local neighbourhood, the success of natural regeneration will mainly be affected by high inter annual variability for seed production. Evaluation of annual cone production by binocular observation of several groups of trees sampled within the stand is relevant to optimize this silvicultural choice and should be carried out before planning any release cutting. In favourable years, selection of mother trees in shelterwood or seed tree systems should combine both individual reproductive capacity such as crown size and cone abundance and phenotypic value for traits of economic interest. At management unit scale, a clumped spatial structure of pines should increase the mating success of a relatively small number of intraclump pollen donors (Robledo-Arnuncio

and Austerlitz, 2006). Compared to a random distribution of trees, clumping will induce a decrease in the effective number of pollen donors that contribute to the diversity of seed pool.

In mixed stands managed under shelterwood or seed tree systems, decision about location of future pine regeneration zones is constrained by limited seed dispersal capacity. Under such limitation, most of natural regeneration patches will occur at less than 50 m around dense pine clumps. Field managers will have the possibility to favour establishment of regeneration patches according to two different spatial patterns: 1) adjacent clear cuttings around each adult clump will lead to a continuous ring of seedlings; 2) a distinct silvicultural choice to limit enlargement of pine zones from one generation to another will consist in concentrating pine regeneration in only few adjacent patches. When distance between pine clumps limit interclump gene flows and as seed dispersal is limited, one should suspect lack of diversity and establishment of spatial genetic structure within seedling zones (Robledo-Arnuncio and Austerlitz, 2006; Takahashi et al., 2000). Such phenomena might favour biparental inbreeding along successive cycles of natural regeneration. One solution to limit them should be the introduction of less inbred reproductive material by planting or direct sowing. In our case study genetic basis of the initial pine introduction is unknown and should be evaluated in order to avoid any supplementary genetic risk.

Once regeneration design has been chosen, negative influence of micro environmental conditions on seed germination should be reduced as far as possible to increase seedling density. Under storey vegetation control and seedbed preparation have proved to have a positive effect on seedling establishment (Winsa, 1995; Beland et al., 2000; Lee et al., 2004) and are highly recommended. Because the best conditions for natural regeneration occur if scarification is realized shortly before an abundant seed-fall (Karlsson and Örländer, 2000), site preparation should be planned during late March in our plain conditions to avoid any weed development before the massive seed dispersal event.

When viable pine saplings and accompanying species start developing in mixed stands, technical decisions such as species composition and individual selections along successive thinnings will affect spatial structure of the future adult population. Hence these decisions should favor pine aggregates to ensure the success of the next natural regeneration cycle (Paluch and Bartkowicz, 2004). Artificial creation of additional pine patches by enrichment planting or sowing with appropriate material might improve simultaneously spatial structure of the mixed stand and the genetic diversity and the adaptation of the pine population.

References

- Agestam, E., Karlsson, M., Nilsson, U., 2005. Mixed forests as a part of sustainable forestry in southern Sweden. *Journal of Sustainable Forestry* 21, 101-117.
- Beland, M., Agestam, E., Eko, P.M., Gemmel, P., Nilsson, U., 2000. Scarification and seedfall affects natural regeneration of Scots pine under two shelterwood densities and a clear-cut in southern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15, 247-255.
- Camarero, J.J., Gutierrez, E., Fortin, M.J., Ribbens, E., 2005. Spatial patterns of tree recruitment in a relict population of *Pinus uncinata*: forest expansion through stratified diffusion. *Journal of Biogeography* 32, 1979-1992.
- Canham, C.D., Uriarte, M., 2006. Analysis of neighbourhood dynamics of forest ecosystems using likelihood methods and modelling. *Ecological Applications* 16, 62.
- Castro, J., Gomez, J.M., Garcia, D., Zamora, R., Hodar, J.A., 1999. Seed predation and dispersal in relict Scots pine forests in southern Spain. *Plant Ecology* 145, 115-123.
- Clark, J.S., 1993. Paleoecological perspectives on modelling broad-scale responses to global change. In: P. Kareiva, J.G. Kingsolver, and R. B. Huey (Ed.), *Biotic interactions and global change*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, p. 315–332.
- Clark, J.S., 1998. Why trees migrate so fast: confronting theory with dispersal biology and the paleorecord. *American Naturalist* 152, 204-224.
- Clark, J.S., Macklin, E., Wood, L., 1998. Stages and spatial scales of recruitment limitation in southern Appalachian forests. *Ecological Monographs* 68, 213.
- Clark, J.S., Beckage, B., Camill, P., Cleveland, B., HilleRisLambers, J., Lichter, J., McLachlan, J., Mohan, J., Wyckoff, P., 1999a. Interpreting recruitment limitation in forests. *American Journal of Botany* 86, 1-16.
- Clark, J.S., Silman, M., Kern, R., Macklin, E., HilleRisLambers, J., 1999b. Seed dispersal near and far: Patterns across temperate and tropical forests. *Ecology* 80, 1475-1494.
- Debain, S., Curt, T., Lepart, J., Prevosto, B., 2003. Reproductive variability in *Pinus sylvestris* in southern France: implications for invasion. *Journal of Vegetation Science* 14, 509-516.
- Debain, S., Chadoeuf, J., Curt, T., Kunstler, G., Lepart, J., 2007. Comparing effective dispersal in expanding population of *Pinus sylvestris* and *Pinus nigra* in calcareous grassland. *Canadian Journal of Forest Research* 37, 705-718.
- Geritz, S.A.H., Dejong, T.J., Klinkhamer, P.G.L., 1984. The Efficacy of Dispersal in Relation to Safe Site Area and Seed Production. *Oecologia* 62, 219-221.
- Gonzalez-Martinez, S.C., Gerber, S., Cervera, M.T., Martinez-Zapater, J.M., Gil, L., Alia, R., 2002. Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1290-1297.

- Goslee, S.C., Urban, D.L., 2007. The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* 22, 1-19.
- Götmark, F., Berglund, A., Wiklander, K., 2005. Browsing damage on broadleaved trees in semi-natural temperate forest in Sweden, with a focus on oak regeneration. *Scandinavian Journal of Forest Research* 20, 223-234.
- Goubitz, S., Nathan, R., Roitemberg, R., Shmida, A., Ne'eman, G., 2004. Canopy seed bank structure in relation to: fire, tree size and density. *Plant Ecology* 173, 191–201.
- Greene, D.F., Johnson, E.A., 1989. Particulate diffusion models and the dispersal of seeds by the wind. *Trends in Ecology and Evolution* 4, 191-192.
- Greene, D.F., Johnson, E.A., 1995. Long-Distance Wind Dispersal of Tree Seeds. *Canadian Journal of Botany* 73, 1036-1045.
- Greene, D.F., Calogeropoulos, C., 2002. Measuring and modelling seed dispersal in terrestrial plants. In: J.M. Bullock, R.E. Kenward, Hails, R.S. (Eds.), *Dispersal Ecology*, The 42nd Symposium of the British Ecological Society. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK., Reading, UK, 3–23.
- Guittet, J., Laberche, J., 1974. L'implantation naturelle du pin sylvestre sur pelouse xérophile en forêt de Fontainebleau. II.- Démographie des graines et des plantules au voisinage des vieux arbres. *Oecologia Plantarum* 9, 111-130.
- Hannerz, M., Almqvist, U., Hornfeldt, R., 2002. Timing of seed dispersal in *Pinus sylvestris* stands in central Sweden. *Silva Fennica* 36, 757-765.
- Hilli, A., Hokkanen, T., Hyvonen, J., Sutinen, M.L., 2008. Long-term variation in Scots pine seed crop size and quality in northern Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research* 23, 395-403.
- Hougaard, C., Colding, J., Soderqvist, T., 2006. Economic valuation of a seed dispersal service in the Stockholm National Urban Park, Sweden. *Ecological Economics* 59, 364-374.
- Howe, H.F., Smallwood, J., 1982. Ecology of Seed Dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13, 201-228.
- Hytytainen, K., Ilomaki, S., Makela, A., Kinnunen, K., 2006. Economic analysis of stand establishment for Scots pine. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 1179-1189.
- Johansson, T., 2003. Mixed stands in Nordic countries - a challenge for the future. *Biomass and Bioenergy* 24, 365-372.
- Jones, F.A., Muller-Landau, H.C., 2008. Measuring long-distance seed dispersal in complex natural environments: an evaluation and integration of classical and genetic methods. *Journal of Ecology (Oxford)* 96, 642-652.
- Karkkainen, K., Savolainen, O., 1993. The degree of early inbreeding depression determines the selfing rate at the seed stage - model and results from *Pinus sylvestris* (Scots Pine). *Heredity* 71, 160-166.

- Karlsson, C., 2000. Seed production of *Pinus sylvestris* after release cutting. *Canadian Journal of Forest Research* 30, 982-989.
- Karlsson, C., Örlander, G., 2000. Soil scarification shortly before a rich seed fall improves seedling establishment in seed tree stands of *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15, 256-266.
- Katul, G.G., Porporato, A., Nathan, R., Siqueira, M., Soons, M.B., Poggi, D., Horn, H.S., Levin, S.A., 2005. Mechanistic analytical models for long-distance seed dispersal by wind. *American Naturalist* 166, 368-381.
- Kerr, G., Gosling, P., Morgan, G., Stokes, V., Cunningham, V., Parratt, M., 2008. Seed production and seedling survival in a 50-year-old stand of Corsican pine (*Pinus nigra* subsp *laricio*) in southern Britain. *Forestry* 81, 525-541.
- Lee, C.S., Kim, J.H., Yi, H., You, Y.H., 2004. Seedling establishment and regeneration of Korean red pine (*Pinus densiflora* S. et Z.) forests in Korea in relation to soil moisture. *Forest Ecology and Management* 199, 423-432.
- Lefevre, F., 2004. Human impacts on forest genetic resources in the temperate zone: an updated review. *Forest Ecology and Management* 197, 257-271.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Stenlid, J., Vasiliauskas, A., 2004. Silvicultural and pathological evaluation of Scots pine afforestations mixed with deciduous trees to reduce the infections by *Heterobasidion annosum* s.s. *Forest Ecology and Management* 201, 275-285.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
- McNeil, W.M., 1954. Observation on cone and seed production in plantations of Scots pine in Scotland. *Forestry* 27, 122-133.
- Nakashizuka, T., 2001. Species coexistence in temperate, mixed deciduous forests. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 205-210.
- Nathan, R., Muller-Landau, H.C., 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology and Evolution* 15, 278-285.
- Nathan, R., Safriel, U.N., Noy-Meir, I., Schiller, G., 2000. Spatiotemporal variation in seed dispersal and recruitment near and far from *Pinus halepensis* trees. *Ecology* 81, 2156-2169.
- Nathan, R., Safriel, U.N., Noy-Meir, I., 2001. Field validation and sensitivity analysis of a mechanistic model for tree seed dispersal by wind. *Ecology* 82, 374-388.
- Nathan, R., Schurr, F.M., Spiegel, O., Steinitz, O., Trakhtenbrot, A., Tsoar, A., 2008. Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends in Ecology and Evolution* 23, 638-647.

- Ngo Bieng, M.A., Ginisty, C., Goreaud, F., Perot, T., 2006. A first typology of Oak and Scots pine mixed stands in the Orleans forest (France), based on the canopy spatial structure. *New Zealand Journal of Forestry Science* 36, 325-346.
- Ngo Bieng, M.A., 2007. Construction de modèles de structure spatiale permettant de simuler des peuplements virtuels réalistes. Application aux peuplements mélangés chêne sessile - pin sylvestre de la région centre. PhD Thesis, ENGREF, 213 p.
- Oden, N.L., Sokal, R.R., 1986. Directional autocorrelation: an extension of spatial correlograms to two dimensions. *Systematic Zoology* 35, 608–617.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2008. vegan: Community Ecology Package.
- Otto, H.J., 1997. Les forêts de Basse-Saxe en Allemagne du nord: un passé difficile commande une gestion nouvelle. Deuxième partie: le programme gouvernemental « LÖWE », principes d'une sylviculture proche de la nature. *Revue Forestière Française* 49, 477-488.
- Palowski, B., 2000. Seed yield from polluted stands of *Pinus sylvestris* L. *New Forest* 20, 15-22.
- Paluch, J.G., Barkowicz L.E., 2004. Spatial interactions between Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), common oak (*Quercus robur* L.) and silver birch (*Betula pendula* Roth.) as investigated in stratified stands in mesotrophic site conditions. *Forest Ecology and Management* 192, 229-240.
- Pardos, M., Montes, F., Canellas, I., 2008. Spatial dynamics of natural regeneration in two differently managed *Pinus sylvestris* stands before and after silvicultural intervention using replicated spatial point patterns. *Forest Science* 54, 260-272.
- Prescher, F., Lindgren, D., Almqvist, C., Kroon, J., Lestander, T.A., Mullin, T.J., 2007. Female fertility variation in mature *Pinus sylvestris* clonal seed orchards. *Scandinavian Journal of Forest Research* 22, 280-289.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ribbens, E., Silander, J.A., Pacala, S.W., 1994. Seedling Recruitment in Forests - Calibrating Models to Predict Patterns of Tree Seedling Dispersion. *Ecology* 75, 1794-1806.
- Robledo-Arnuncio, J.J., Alia, R., Gil, L., 2004. Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology* 13, 2567-2577.
- Robledo-Arnuncio, J.J., Austerlitz, F., 2006. Pollen dispersal in spatially aggregated populations. *The American Naturalist* 168, 500-511
- Ruuska, J., Siipilehto, J., Valkonen, S., 2008. Effect of edge stands on the development of young *Pinus sylvestris* stands in southern Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research* 23, 214-226.

- Sagnard, F., Pichot, C., Dreyfus, P., Jordano, P., Fady, B., 2007. Modelling seed dispersal to predict seedling recruitment: recolonization dynamics in a plantation forest. *Ecological Modelling* 203, 464-474.
- Sarvas, R., 1962. Investigations on the Flowering and Seed Crop of *Pinus sylvestris*. *Communicationes Instituti Forestale Fennica* 53, 1-198.
- Schupp, E.W., Fuentes, M., 1995. Spatial patterns of seed dispersal and the unification of plant population ecology. *Ecoscience* 2, 267-275.
- Schurr, F.M., Bond, W.J., Midgley, G.F., Higgins, S.I., 2005. A mechanistic model for secondary seed dispersal by wind and its experimental validation. *Journal of Ecology (Oxford)* 93, 1017-1028.
- Schurr, F.M., Steinitz, O., Nathan, R., 2008. Plant fecundity and seed dispersal in spatially heterogeneous environments: models, mechanisms and estimation. *Journal of Ecology* 96, 628-641.
- Scotti, I., Gugerli, F., Pastorelli, R., Sebastiani, F., Vendramin, G.G., 2008. Maternally and paternally inherited molecular markers elucidate population patterns and inferred dispersal processes on a small scale within a subalpine stand of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Forest Ecology and Management* 255, 3806-3812.
- Simard, M., Payette, S., 2005. Reduction of black spruce seed bank by spruce budworm infestation compromises postfire stand regeneration. *Canadian Journal of Forest Research* 35, 1686-1696.
- Smouse, P.E., Long, J.C., Sokal, R.R., 1986. Multiple-Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. *Systematic Zoology* 35, 627-632.
- Stoyan, D., Wagner, S., 2001. Estimating the fruit dispersion of anemochorous forest trees. *Ecological Modelling* 145, 35-47.
- Takahashi, M., Mukouda, M., Koono, K., 2000. Differences in genetic structure between two Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) stands. *Heredity* 84, 103-115.
- Winsa, H., 1995. Influence of rain shelter and site preparation on seedling emergence of *Pinus sylvestris* L. after direct seedling. *Scandinavian Journal of Forest Research* 10, 167-175.
- Yazdani, R., Lindgren, D., Stewart, S., 1989. Gene dispersion within a population of *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 4, 295-306.

2. Etude de la structure génétique d'une jeune régénération naturelle dans le site de Haguenau.

2.1 Objectifs de l'étude

La connaissance des patrons de dispersion des graines représente un premier volet dans l'étude de la dynamique des populations. Toutefois, étant donné l'importance des facteurs génétiques sur la survie et la croissance des individus (Morgante et al., 1997 ; Kuittinen et al., 1991 ; Muona et al., 1997 ; Ledig, 1998), il s'avère également important de connaître la composition génétique de la régénération. Une meilleure connaissance du niveau moyen de diversité permet de mettre en évidence une éventuelle dérive génétique pouvant elle-même conduire à une augmentation du niveau de consanguinité et une diminution des performances de croissance et de reproduction (Karkkainen et Savolainen, 1993). De même, la structure génétique spatiale du peuplement reproducteur de la génération $n+1$ peut être fortement influencée par celle des semis qui en sont à l'origine, elle-même dépendante de celle du peuplement semencier (la génération n) qui leur ont donné naissance (Knowles et al., 1992).

La plupart des études ayant comparé peuplement adulte et régénération visent généralement à vérifier si la diversité génétique de la régénération naturelle reflète celle du peuplement reproducteur (régime panmictique) et à évaluer l'influence des modes de régénération (coupes rases, par trouées, éclaircies progressives) sur la diversité génétique (El-Kassaby et Jaquish, 1996 ; Adams et al., 1997 ; Glaubitz et al., 2003 ; Rajora et Pluhar, 2003). Par exemple Neale (1985) et Adams et al (1998) ont montré que les coupes d'ensemencement à très faible densité (15-30 individus/ha) ou par petites troués (0,2 ha) avaient peu d'influence sur la diversité génétique neutre de la régénération obtenue. Cette comparaison parents-descendants ne doit être extrapolée à un suivi de diversité génétique entre générations d'individus reproducteurs. En effet, plusieurs études ont déjà montré que la diversité génétique évoluait au cours de la vie du peuplement avec notamment un déficit d'hétérozygotie observée dans les tous premiers stades sur de jeunes semis et un déficit non significatif voir un excès d'hétérozygotie chez les individus adultes (Yazdani et al., 1985). Donc rien n'indique que le peuplement semencier issu de cette régénération aura les mêmes caractéristiques de diversité génétique (niveau et structuration) que celles du peuplement adulte d'origine. Il faudrait donc, en toute rigueur, comparer les générations au même stade d'âge, ce qui, compte tenu de la longueur de celles-ci chez les arbres forestiers, n'est guère envisageable. Dans les études disponibles souvent

Objectifs	Age des semis étudiés	Type d'échantillonnage	Unité de surface échantillonnée
Structuration spatiale de la diversité génétique évaluée sur de jeunes	n n+3	exhaustif exhaustif	Plots A,B,C,D : 5 à 8 x 1m ² Plot E : 18 m ²
Suivi démographique de la diversité génétique 2003-2006	De n à n+4 tous les ans	exhaustif	Plots A,B,C,D : 5 à 7 x 1m ²

Tableau V.1 : Récapitulatif du matériel végétal utilisé dans les études du chapitre V sur le site de Haguenau. Pour plus de détails, se référer au chapitre II.

Plot	Locus	N	A	Ae	Ho	He	Loiselle	Fis
A	SPAG 714	65	29	17,9	0,77	0,94	-	0,19 ***
	SPAC 125	65	21	10,7	0,83	0,91	-	0,08 ***
	ctg 4363	65	12	4,0	0,58	0,75	-	0,22 ***
	Ptx3025	64	12	2,8	0,63	0,64	-	0,02 ***
	Estimation multilocus						0,008	0,13 ***
B	SPAG 714	59	26	16,0	0,83	0,94	-	0,11 ***
	SPAC 125	59	26	13,9	0,95	0,93	-	-0,02 n.s
	ctg 4363	59	14	5,1	0,71	0,80	-	0,12 ***
	Ptx3025	59	7	2,5	0,59	0,60	-	0,02 n.s
	Estimation multilocus						0,004	0,06 **
C	SPAG 714	65	28	17,5	0,72	0,94	-	0,23 ***
	SPAC 125	65	21	11,3	0,91	0,91	-	0,00 n.s
	ctg 4363	65	15	5,2	0,62	0,81	-	0,24 ***
	Ptx3025	61	7	2,3	0,64	0,56	-	-0,14 n.s
	Estimation multilocus						0,003	0,08 n.s
D	SPAG 714	60	26	18,9	0,68	0,95	-	0,28 ***
	SPAC 125	60	22	11,8	0,95	0,92	-	-0,04 n.s
	ctg 4363	60	10	3,8	0,68	0,74	-	0,08 **
	Ptx3025	48	7	2,3	0,58	0,56	-	-0,05 n.s
	Estimation multilocus						0,004	0,07 **
Ensemble des plots A à D	SPAG 714	244	33	20,5	0,76	0,95	-	0,20 ***
	SPAC 125	248	30	13,1	0,91	0,92	-	0,01 ***
	ctg 4363	229	19	4,2	0,70	0,76	-	0,07 n.s
	Ptx3025	232	14	2,5	0,61	0,60	-	-0,03 n.s
	Estimation multilocus						0,003	0,07 ***
Plot E	SPAG 714	49	24	15,3	0,86	0,93	-	0,08 n.s
	SPAC 125	49	19	14,3	0,90	0,93	-	0,03 n.s
	ctg 4363	49	12	4,5	0,65	0,78	-	0,16 ***
	Ptx3025	-	-	-	-	-	-	-
	Estimation multilocus						0,009	0,09 n.s
Pop Adulte	SPAG 714	456	35	19,6	0,86	0,95	-	0,09 n.s
	SPAC 125	456	43	14,1	0,92	0,93	-	0,01 n.s
	ctg 4363	456	33	3,8	0,69	0,74	-	0,06 *
	Ptx 3025	426	17	2,3	0,52	0,56	-	0,06 n.s
	Estimation multilocus						-	0,05 n.s

Tableau V.2 : Paramètres de diversité génétique estimés à l'aide de 4 marqueurs microsatellites nucléaires dans 5 échantillons exhaustifs de semis de pin sylvestre sur le site de Haguenau. Dans les plots A, B, C et D, tous les semis sont issus d'une dispersion de graines réalisée en 2003. Dans le plot E, tous les semis sont issus d'une dispersion de graines réalisée en 2000.

N, nombre d'individus génotypés ; A, nombre d'allèles observés ; Ae, nombre d'allèles efficaces ; Ho, hétérozygotie observée ; He, hétérozygotie attendue ; Loiselle, coefficient moyen d'apparentement de Loiselle à l'ensemble des loci ; Fis, déficit en hétérozygote estimé (test d'égalité à 0, **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; n.s non significatif).

réalisées sur des semis, il est souvent difficile de dissocier les effets de la dispersion initiale de graines, l'établissement des jeunes semis et l'évolution démographique de la population sur plusieurs années.

Nous avons voulu profiter dans cette thèse du suivi temporel sur le site de Haguenau de différentes cohortes annuelles de régénération naturelle en plusieurs points d'échantillonnage. Ces études ont permis d'une part, d'évaluer le niveau de diversité génétique chez des jeunes semis de quelques semaines ou quelques mois, et d'autre part d'estimer le niveau de différentiation génétique entre différentes zones de régénération au sein d'une même parcelle.

L'analyse de la capacité de dispersion des graines à partir d'analyse de maternité sur semis permet de décrire la dispersion efficace des graines (qui se traduit pour un gestionnaire par la mise en place d'une régénération) et la diversité génétique de la nouvelle population de semis (Gonzales-Martinez et al., 2004). Bien que plus difficiles à mettre en œuvre que les analyses de paternité puisque aucun des deux parents n'est connu, les analyses de maternité apportent toutefois des informations importantes sur le nombre de mères qui participent à la régénération mais aussi sur les composantes du succès reproducteur femelle (Gonzales-Martinez et al., 2006). Ces études sont donc complémentaires de l'analyse par piégeage de graines qui permet de caractériser la dispersion potentielle des semences. Nous avons profité du fait que les points d'échantillonnage de régénération naturelles sont tous situés en zone d'inventaire et génotypage exhaustifs des arbres adultes, pour conduire des analyses de parenté sur ces jeunes semis.

Le **tableau V.1** présente un récapitulatif du matériel végétal échantillonné sur le site de Haguenau pour répondre aux différents objectifs de ces études complémentaires.

L'estimation de la diversité génétique repose sur le génotypage de l'ensemble des individus échantillonnés à l'aide des 4 microsatellites nucléaires et des 6 microsatellites chloroplastiques utilisés pour la caractérisation de la population adulte et présentés dans le chapitre II. Les résultats obtenus sont discutés au regard des informations obtenues dans les chapitres précédents sur la structure du peuplement reproducteur et sur la dispersion du pollen et des graines.

Plot	N	Nh	% haplotype de la population adulte
A	62	43	21
B	53	39	19
C	61	39	19
D	40	34	17
Total	216	96	47

Tableau V.3 : Nombre d'haplotypes définis par 6 microsatellites chloroplastiques et observés dans 4 échantillons exhaustifs de semis de pin sylvestre âgés de moins d'un an et pourcentage de la population d'haplotypes observés dans la population d'arbres adultes du même site.

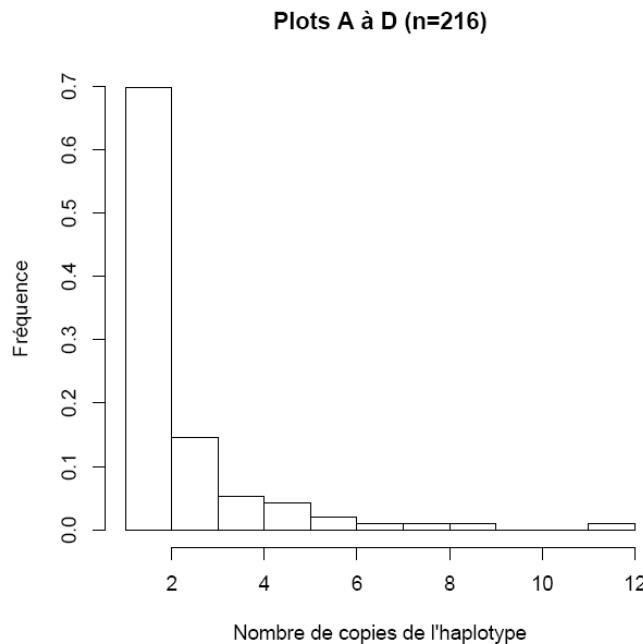


Figure V.1 : Distribution de la fréquence des haplotypes obtenus à l'aide de 6 microsatellites chloroplastiques dans les 4 plots de régénération correspondant à l'évènement de dispersion de graines de 2003. Les différents haplotypes obtenus sont regroupés en fonction de leur représentation dans la population de semis étudiée.

2.2 Diversité génétique chez de jeunes semis de pin sylvestre issus d'un même évènement de dispersion

Le niveau de diversité génétique (A, Ae) pour 4 microsatellites nucléaires et le niveau d'hétérozygotie observé au sein de jeunes semis issus d'une dispersion de graines 2003 et échantillonnés dans 4 zones différentes du site d'étude sont comparables à ceux observés dans la population d'adultes reproducteurs (**Tableau V.2**). Il est à noter que ce niveau de diversité est lui-même très élevé à l'intérieur de chacune de ces 4 zones couvrant des superficies inférieures à 20-30 m² puisque plus de 80% des allèles efficaces ont pu être retrouvés dans ces zones d'une surface couvrant au maximum 8 m². Il est à noter l'existence d'un seul allèle privé au locus SPAG7.14, allèle non identifié dans la population adulte génotypée et présent dans les semis les plus âgés. La diversité génétique de ces jeunes semis âgés de moins d'un an au moment de l'échantillonnage est comparable également à celle observée sur une unité de surface équivalente dans des semis plus âgés de trois années (évenement de dispersion de graines 2000). Aucune différentiation génétique des différentes zones de régénération étudiées (plot A à E) n'a pu être mise en évidence. De très faibles valeurs de coefficient d'apparentement de Loiselle sont observées à tous les points d'échantillonnage. Ces résultats suggèrent l'existence d'un fort brassage génétique à une échelle spatiale fine de la régénération. Si un déficit significatif d'individus hétérozygotes (Fis) est observé dans 3 des 4 groupes de semis âgés de moins d'un an, aucun déficit d'hétérozygotes significatif n'a été mis en évidence dans la zone de semis âgés de 3 ans.

L'analyse de la diversité en haplotypes définis par 6 microsatellites chloroplastiques montre qu'un nombre élevé de pères (au moins 96) sont à l'origine des 216 jeunes semis de moins d'un an échantillonnés dans les 4 zones différentes du site d'étude (**Tableau V.3**). Les haplotypes identifiés représentent cependant moins de 50% des haplotypes rencontrés dans la population adulte. Si 70% des haplotypes ne sont représentés que par un seul semis, certains d'entre eux se révèlent particulièrement fréquents dans la population de semis (**Figure V.1**, **Tableau V.4**). Il faut noter que les haplotypes les plus fréquents dans la population de jeunes semis ne sont pas tous des haplotypes très fréquents dans la population adulte. Par ailleurs, on peut noter pour certains d'entre eux, une identification groupée dans une des 4 zones de régénération échantillonnées sans pour autant pouvoir parler de différentiation des 4 zones pour ces marqueurs à hérédité paternelle.

Les niveaux de diversité génétique mesurés dans des échantillons de jeunes semis issus de régénération naturelle à l'aide de marqueurs nucléaires et chloroplastiques sont élevés.

Code haplotype	Plots A à D	Population adulte	Plot A	Plot B	Plot C	Plot D
104	11	12	2	4	5	0
103	8	10	4	1	2	1
54	8	4	1	3	2	2
108	7	3	5	1	0	1
134	7	10	0	2	3	2
129	6	2	1	0	1	4
47	6	5	2	3	0	1
158	5	10	1	1	3	0
33	5	5	1	1	2	2
146	5	5	3	2	0	0
96	5	3	1	2	1	1
85	5	1	1	0	3	1
107	5	8	0	1	0	4

Tableau V.4 : Liste des haplotypes définis par 6 microsatellites chloroplastiques les plus fréquents dans les 4 échantillons exhaustifs de semis de pin sylvestre âgés de moins d'un an et fréquence de ces haplotypes dans la population d'arbres adultes du même site.

Aucune différenciation génétique significative entre zones de régénération au sein des parcelles 1063 et 1064 n'a pu être mise en évidence mettant en évidence un important brassage génétique à une échelle relativement fine. Les résultats des comparaisons entre la population de reproducteurs présents sur la parcelle et les semis naturels obtenus au cours d'un évènement de dispersion de graines sont à rapprocher de ceux d'Adams et al. (1997) ou Glaubitz et al. (2003) qui n'observaient eux non plus pas de différence entre générations. Chez plusieurs espèces résineuses, le nombre de reproducteurs participant à une régénération naturelle de niveau satisfaisant comme celle observée en 2003 semble donc élevé (Gonzalez-Martinez et al., 2006), et permet le maintien de la diversité génétique de la population parente. La forte diversité d'haplotypes construits sur les marqueurs à hérédité paternelle confirme les résultats observés sur les descendances maternelles dans le chapitre IV à savoir la contribution de très nombreux pères à la régénération. Le très faible apparentement (Fij Loiselle) entre semis au sein de chacun des plots suggère de faibles différences de succès reproducteur des mères qui participent à la production de semis et un nombre élevé de mères à l'origine des semis présents sur une surface restreinte. Ce résultat est en contradiction avec ceux observés sur d'autres espèces de pins où l'on observe généralement que plus de 50% des semis sont produits par un nombre restreint de mères (Gonzalez-Martinez et al., 2006 ; Hedrick, 2005). Cette différence peut s'expliquer à Haguenau par la relativement forte densité d'individus reproducteurs à proximité des plots de régénération (Schnabel et al. 1998 ; Hedrick 2005). En situation de faible densité de semenciers en revanche, on s'attend à ce que seul un nombre restreint d'individus participent au pool de graines à l'origine de la régénération, engendrant ainsi une structure génétique spatiale et un fort apparentement au sein des taches de régénération (Rousset, 2004; Vekemans et Hardy, 2004). La plus grande homogénéité de contribution des différentes mères sur le site de Haguenau pourrait également s'expliquer par des capacités de production de graines globalement réduites chez ces pins très âgés (>140-160 ans). Les différences observées entre individus pour la production de cônes et de graines deviendraient alors trop faibles pour pouvoir mettre en évidence des contributions différencielles des différents semenciers.

Bien que le déficit en hétérozygotes ne soit pas significatif dans les lots de graines récoltés sur les arbres-mères, il apparaît hautement significatif dans 3 des 4 groupes de jeunes semis de un an échantillonnés en 2003. Chez de nombreuses espèces forestières, le déficit en hétérozygotes mesuré par le Fis, a tendance à décroître peu à peu entre le stade graines et le stade adulte reproducteur (Marquardt et Epperson, 2004 ; Jones et al., 2006 ; Farris et Mitton,

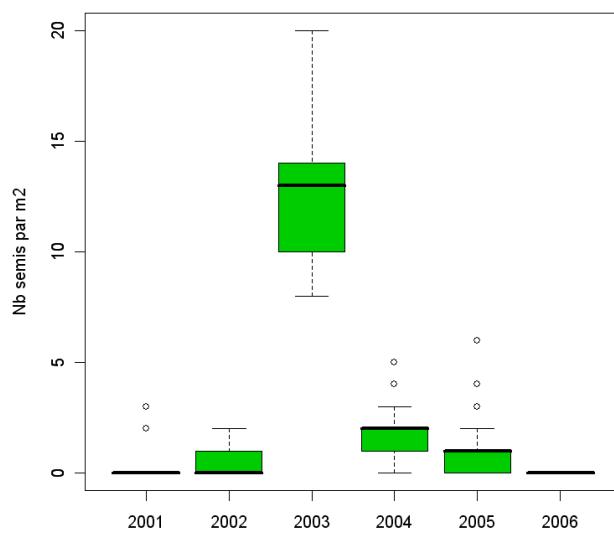


Figure V.2 : Contributions annuelles à la régénération naturelle dans les quatre plots de régénération définis en 2003 et correspondant à 5 à 8 carrés de 1m² par plot. Les boites à pattes ont été élaborées à partir de données observées par carré de 1m² (soit au total 26 carrés de 1m²).

1984). Cette élimination préférentielle des individus homozygotes s'expliquerait par une dépression de consanguinité éliminant des individus issus de croisement entre apparentés (Yazdani et al., 1985). Il est toutefois important de noter que dans cette étude, le déficit n'est pas significatif au stade graines mais uniquement au stade semis. Ce déficit ne peut être expliqué par la présence d'allèles nuls, car les analyses en descendances maternelles n'ont détecté aucune distorsion de ségrégation des allèles. De plus, le contrôle expérimental de l'homogénéité en âge des différents semis conduit à rejeter l'hypothèse d'un éventuel effet Wahlund du fait de l'échantillonnage de plusieurs générations de semis de composition génétique différente. La troisième origine possible à ce déficit reste donc l'hypothèse de semis issus de croisements entre individus apparentés (Ueno et al., 2006 ; Marquart et al., 2007), croisements favorisés par la présence d'une structuration spatiale de la diversité dans les parties les plus denses de la parcelle.

2.3 Evolution démographique et génétique de jeunes semis issus de régénération naturelle entre 1 et 4 ans

Au cours des 4 années de suivi démographique réalisé de façon exhaustive sur les surfaces représentant les plots A à D (2003 à 2006), nous avons pu observer que la très grande majorité des semis des plots de régénération étaient issus d'une seule année de dispersion de graines en l'occurrence l'année 2003 (**Figure V.2**). Dans ce site expérimental où la fructification d'arbres très âgés est relativement faible, les autres années de fructification ne contribuent plus de manière quantitative au recrutement de jeunes semis. D'un point de vue qualitatif, il nous a été impossible de comparer les niveaux de diversité génétique apportée par chacune de ces contributions annuelles en raison des effectifs disponibles.

La contribution prépondérante d'une année de dispersion de graines à la régénération naturelle observée sur le site de Haguenau peut être expliquée par le phénomène de 'masting' (i.e l'alternance de bonnes et de mauvaises années de fructification) couramment observé chez les arbres forestiers (Kelly et Sork, 2002). La fructification de l'année 2003, à relier à la floraison de l'année 2001, semble donc avoir été particulièrement élevée. Malheureusement nous ne possédons pas d'observation de floraison en 2001. Ce résultat souligne l'importance du choix de l'année de mise en régénération car une année de bonne fructification permet d'acquérir une régénération quantitativement importante sans avoir à attendre le cumul des contributions de plusieurs années. Des contributions quantitativement faibles localement peuvent toutefois avoir des répercussions importantes du point de vue génétique (voir revue

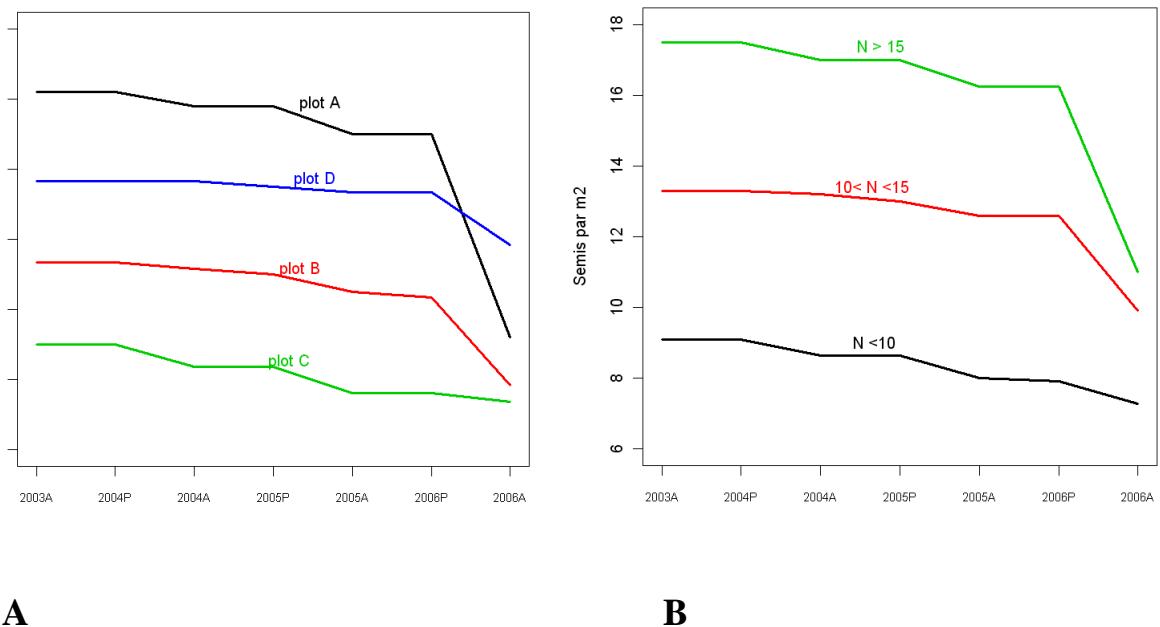


Figure V.3 : (a) Evolution des effectifs de semis vivants durant les trois premières années de développement de la régénération en 2003 dans les plots A, B, C et D. Un plot est associé à chaque couleur de courbe. (b) Evolution des effectifs de semis vivants durant les trois premières années de développement de la régénération en 2003 dans les cadres de $1m^2$ présentant respectivement moins de 10 semis, entre 10 et 15 semis et plus de 15 semis en 2003.

dans Lefèvre, 2004), d'autant plus que leur cumul peut s'avérer important à l'échelle de l'unité de gestion. Dans l'hypothèse d'apports de semis supplémentaires lors d'épisodes de fructifications significatives successives (comme celle de 2003), il serait intéressant d'évaluer la contribution individuelle ou cumulée des années autres que 2003 pour leur diversité et leur degré de différentiation. Rares sont en effet les travaux qui analysent les caractéristiques génétiques de contributions annuelles à une régénération naturelle et donc l'intérêt d'un étalement dans le temps de cette opération de renouvellement pour constituer une nouvelle population aux caractéristiques génétiques proches de celles de la population parentale (Boussaid, 2008).

Le suivi de mortalité réalisé durant ces quatre années met en évidence une survie des semis généralement élevée pendant les trois premières années, avec quelques légères différences entre les zones A, B, C et D (**Figure V.3 a**). Le taux de mortalité, quasiment nul durant les trois premières années, augmente fortement durant l'année 4 pour atteindre de 19,7 à 37,2%. Il n'est pas à attribuer à des conditions climatiques particulièrement défavorable au cours de la saison de végétation 2006. Il est plus marqué dans les zones où la régénération initiale était plus dense. Un regroupement des informations relevées par cadre de 1 m², non plus par zone d'étude mais par densité initiale de régénération (Nb de semis au m²) montre que les mortalités sont d'autant plus élevées que la densité locale de semis est elle-même élevée (**Figure V.3 b**). A la fin de 2006, la densité de semis atteint alors un niveau sensiblement identique dans les différents plots, de 8 à 12 semis/m². La mortalité observée pourrait être associée au développement d'effets de compétition entre semis très importants à partir de la quatrième année. La compétition pour la lumière mais aussi les ressources nutritives et en eau représenterait donc une pression de sélection significative au sein des tâches de régénération et de force variable suivant la densité de semis initialement dispersés. Soulignons qu'en situation de limite méridionale d'aire naturelle du pin sylvestre, Castro et al. (2004) ont montré, que malgré la faible densité initiale de semis, la mortalité agissait principalement durant les deux premières saisons de végétation ; dans le cas de Haguenau, des conditions de croissance moins limitantes en période estivale semblent repousser l'apparition de mortalités lorsque les effets de compétition deviennent importants. L'effet de la densité sur l'intensité de la sélection est d'une importance considérable dans la définition des seuils de densité de semis jugés acceptables pour considérer comme acquise une régénération naturelle. En effet, un seuil fixé trop bas ne permettra pas la purge précoce des individus peu aptes à la compétition et en particulier les individus manifestant de la dépression de consanguinité. On peut donc s'interroger sur les conséquences génétiques de

Plot	N	Aucun parent ou couple compatible	Au moins un parent ou couple compatible			Distance individu non génotypé
			p>0,15	p<0,15	p<0,05	
A	65	13	13	18	21	150m
B	59	13	15	14	17	100m
C	64	60	4	0	0	30m
D	57	8	18	13	18	125m
Total	245	94	50	45	56	-

Tableau V.5 : Nombre de relations parents/semis estimées dans chaque zone de régénération à partir des analyses de maternité sur 4 loci microsatellites nucléaires. La distance au premier arbre adulte est indiquée. Les valeurs de p définissent la probabilité d'attribuer un couple parental faux à un semis alors que celui-ci possède le LOD score le plus élevé. Les valeurs de $p < 0,15$ et $p < 0,05$ correspondent aux seuils de 85% et 95% définis à l'aide du logiciel CERVUS.

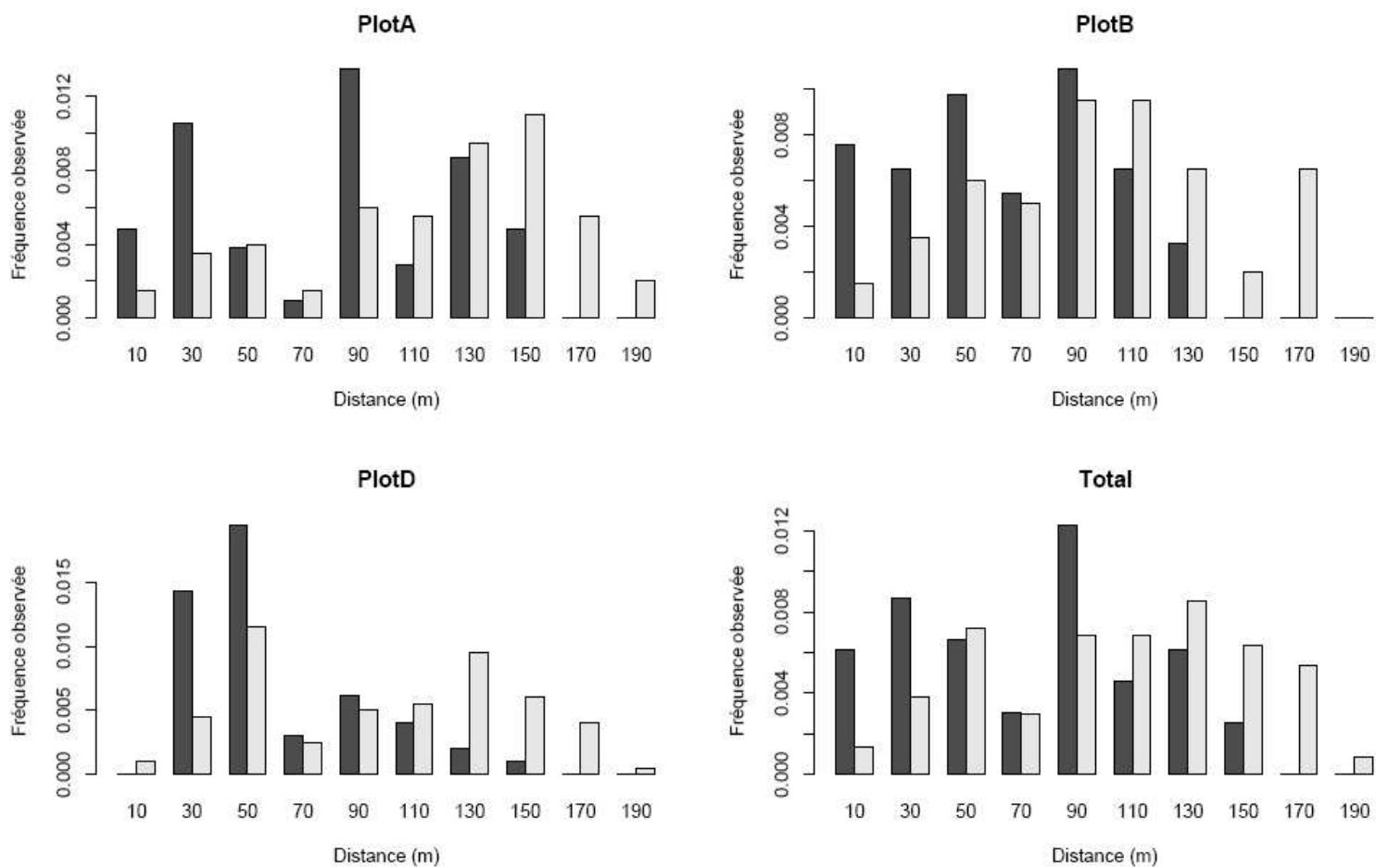


Figure V.4 : Histogrammes de la distribution des distances de dispersion des graines estimées à partir des analyses de maternité (barres noires) et attendues pour une dispersion aléatoire (barres grises). A noter un excès de dispersion dans les courtes distances.

l’application de seuils (minimaux) de densité de 1 000 semis/ha (de 2 ans au moins) retenus par exemple pour les résineux dans le cadre de la reconstitution des forêts après la tempête de 1999 (Mortier, 2001). Cette valeur de seuil est à basse en comparaison des densités de semis observées dans les peuplements âgés peu fructifères de Haguenau après 2 saisons de végétation (80 000 à 170 000 semis/ha) ou dans le peuplement mélangé partiellement isolé d’Orléans juste après germination (maximum de 250 000 semis/ha).

2.4 Analyses de maternité sur semis

Les analyses de maternité menées sur les semis à partir des individus adultes échantillonnés aux alentours des plots de régénération ont permis d’attribuer un ou plusieurs couples de parents aux différents semis génotypés. La faible probabilité de non exclusion d’un couple de parent ($p = 0,0001$), calculée à l’aide du logiciel Cervus à partir des données nucléaires sur 4 loci, démontre la bonne capacité à mener des analyses de maternité. Pour l’ensemble des semis analysés dans les points d’échantillonnage A, B et D, plus de 80% possèdent au moins un couple d’individus compatibles aux 4 loci nucléaires dans la zone d’échantillonnage (**Tableau V.5**). Dans la zone C pour lesquels les efforts de génotypage exhaustif des arbres adultes se sont limités à un rayon de 30 m autour des semis, l’identification d’un ou des deux parents a été très limitée. Dans les trois autres zones, en raison du grand nombre d’individus parents potentiels, nous n’avons jamais observé de cas où un semis présentait un génotype compatible avec un seul couple de parents. Pour tous les semis étudiés, plusieurs couples de génotypes parents sont compatibles et la différence de LOD score (delta) permet de sélectionner le couple de parents le plus vraisemblable pour différents risques d’erreurs ($p<0.05$; $p<0.15$, $p>0.15$).

Les distances estimées de dispersion des semis (plots A, B et D confondus) suivent une distribution légèrement bimodale avec un premier pic de dispersion à 30-50m et un deuxième pic aux environ de 90m (**Figure V.4**). La distance de dispersion est en moyenne de 73 m pour l’ensemble des semis étudiés dans les trois zones A, B et D du site (**Tableau V.6**). Les distances maximales observées atteignent 150 m. En comparant la distribution potentielle (i.e l’ensemble des distances possibles entre le plot de régénération et les mères potentielles) à la distribution observée à l’aide d’un test de Kolmogorov-Smirnov, il apparaît qu’il existe une différence significative de distribution pour l’ensemble des plots (**Tableau V.6**). La distribution des distances de dispersion présente un excès d’évènements dans les courtes

Plot	N	Nombre de maternité attribuées (p<0,15)	Nombre de mères différentes	Distance moyenne de	Distance médiane de	Nombre de mères à moins de 50m	Ecart à la distribution potentielle
A	65	39	29	80	94	11	D=0,353***
B	59	31	26	64	61	12	D=0,351***
C	64	0	-	-	-	-	-
D	57	31	23	60	47	17	D=0,393***
Total	245	101	57	73	82	40	D=0,318***

Tableau V.6 : Distances de dispersion réalisée moyenne et médiane dans chacune des 4 zones de régénération étudiée. Distances estimées à partir des couples parents potentiels-semis choisis au seuil de 85% (i.e $p < 0,15$). Les valeurs du test de Kolmogorov-Smirnov d'écart à la distribution attendue sont données dans la dernière colonne (**p-value < 0,001).

distances et un déficit de dispersion dans les distances dépassant 100m par rapport à la dispersion attendue (**Figure V.4**).

Les capacités de dispersion de graines estimées à partir des jeunes semis à Haguenau sont relativement plus élevées que celles obtenus par piégeage de graines à Orléans (voir projet d'article Aspe et al., § 1.3 de ce chapitre). Elles sont néanmoins compatibles avec des distances de dispersion estimées à partir d'analyses de maternité sur semis chez d'autres espèces de pin (Gonzales-Martinez et al., 2006). Les différences observées entre sites expérimentaux peuvent être attribuées à la difficulté, lors des analyses de maternité sur semis, de séparer les effets de la dispersion des graines *sensu stricto* et les conséquences des processus biologiques intervenant après la dispersion (survie, germination,). La dispersion observée sur pin sylvestre présente une distribution bimodale identique à celle obtenue dans d'autres études de dispersion sur semis (Gonzales-Martinez et al., 2002 ; Gonzales-Martinez et al., 2006) ou à partir de lâchers de graines (Camarero et al., 2005). Cette bimodalité peut s'expliquer par un processus de dispersion comportant deux phases : des événements de dispersion fréquents à courte distance couplés à des événements plus rares à moyenne et longue distance engendrés, chez les espèces anémochores, par des turbulences aérologiques (Camarero et al., 2005 ; Clark et al., 1999b ; Higgins et Richardson, 1999).

3. Conclusion

L'analyse des patrons de dispersion des graines dans plusieurs peuplements de pin sylvestre nous a montré qu'une forte proportion de ces semences était dispersée à moins de 50m de leur source. Nous avons vu par ailleurs que les capacités reproductrices du peuplement influençaient fortement l'intensité de la pluie de graines. La distribution des pins adultes dans le peuplement joue aussi un rôle important dans la répartition spatiale des graines, et détermine ainsi les emplacements où il est possible d'envisager une régénération naturelle d'un point de vue quantitatif au moins. La réceptivité du sol peut toutefois modifier fortement les patrons de dispersion efficace des graines.

Dans les conditions de Haguenau, la mise en place d'une régénération naturelle semble essentiellement due à une seule bonne année de fructification, les années suivantes ou précédentes contribuant peu, d'un point de vue quantitatif, à la production de semis. Il conviendrait de suivre les contributions relatives de pluies successives de graines dans des peuplements de pin sylvestre moins âgés dans lesquels le niveau de production de graines est plus élevé et où la variabilité individuelle des capacités de fructification est plus marquée. Aucune structuration spatiale des jeunes semis n'a pu être mise en évidence. De plus, la

diversité génétique globale des semis dispersés apparaît similaire à celle du peuplement parent, traduisant un important brassage génétique à travers le cumul des flux de pollen et des flux de graines. La densité de semis joue ici un rôle important dans le processus de sélection naturelle. Le seuil (en nombre de semis/ha) à partir duquel on considère une régénération naturelle comme acquise peut ainsi jouer un rôle important sur la précocité et l'intensité de la purge par sélection naturelle des semis consanguins et donc sur les caractéristiques génétiques du futur peuplement.

Les travaux conduits sur les deux sites expérimentaux de Haguenau et d'Orléans, tant en ce qui concerne les flux de pollen que les flux de graines, ont à plusieurs reprises mis en évidence que les modes de gestion et les décisions techniques prises au long du cycle sylvicole pouvaient avoir des conséquences génétiques, et ce à diverses échelles spatiales. La composition d'un massif forestier, en espèces et en origines géographiques, résulte de choix de modes de renouvellement et de choix de MFR qui vont déterminer le degré d'isolement relatif d'une espèce et d'une origine donnée. Ce degré d'isolement influera à son tour non seulement sur la nature et l'intensité des flux de gènes (pollen, graines) (voir Chapitre IV) mais aussi sur les capacités fructifères des boisements (voir Chapitre V), conduisant le gestionnaire, avant mise en régénération, à une analyse préalable de l'environnement d'une unité de gestion à l'échelle de l'unité de reproduction.

A l'échelle de l'unité de gestion, la structure génétique spatiale et la répartition des tiges du peuplement reproducteur résultent pour partie de l'origine (naturelle, artificielle) et des caractéristiques biologiques de ce peuplement mais aussi des interventions successives du forestier (dépressions, éclaircies). Or la structure génétique spatiale et la répartition des tiges adultes vont directement influer sur les flux de pollen (Chapitre IV) et les flux de graines (Chapitre V) en qualité et en quantité et donc affecter l'intensité et la répartition spatiale de la production de graines, la composition génétique de cette production et sa structuration génétique spatiale, conditionnant ainsi fortement les caractéristiques des futurs peuplements aux générations suivantes. De plus la mise en place effective d'une régénération naturelle et les caractéristiques génétiques de cette régénération dépendra fortement de la synchronisation entre fructification annuelle d'une part et coupe de régénération puis interventions au sol destinées à favoriser la germination des graines produites d'autre part.

Chapitre VI

Discussion générale et perspectives



A. Valadon

Chapitre VI : Discussion générale – Perspectives

Les travaux conduits dans cette thèse se sont intéressés aux déterminants majeurs des flux de pollen et flux de graines permettant d'obtenir une qualité génétique satisfaisante des jeunes semis de pin sylvestre recrutés en régénération naturelle. La confrontation des résultats observés à ceux obtenus dans la littérature sur la même espèce ou sur d'autres espèces anémophiles et anémochores permet :

- de souligner dans une première partie qu'il est important de caractériser l'unité de reproduction à l'origine des futurs semis, ceci pour des peuplements forestiers différents en terme d'objectifs, de composition et de structure ;
- et de formuler dans une deuxième partie des conseils aux gestionnaires forestiers afin de gérer au mieux la diversité génétique dans cette étape clé de renouvellement des populations forestières.

1. Bilan des connaissances acquises sur le régime de reproduction du pin sylvestre dans deux types de peuplements forestiers contrastés

1.1 Une unité de reproduction à caractériser à différentes échelles

Dans les différents chapitres de cette thèse, nous avons pu mettre en évidence qu'il était important de caractériser l'unité de reproduction rassemblant tous les individus participant à la population de graines recrutée sur l'unité de gestion en cours de régénération. Ces individus peuvent être soit des polliniseurs des semenciers ayant produit ces graines, soit ces semenciers eux-mêmes, soit les deux à la fois. Si ces individus appartiennent en grande majorité à l'unité de gestion, l'ampleur observée des flux de pollen à moyenne et longue distance montre que l'unité de reproduction est dans de nombreux cas bien plus large que l'unité de gestion. Afin de caractériser au mieux cette unité de reproduction, il convient de s'intéresser au minimum aux trois échelles suivantes :

- *le niveau individuel.* Dans les chapitres IV et V, nous avons pu montrer que dans toutes les situations expérimentales observées, il existe une forte variabilité individuelle pour les succès reproducteurs mâles et femelles. Cette variabilité est particulièrement marquée pour les bonnes années de floraison et de fructification qui sont celles choisies (en théorie du moins, hors contraintes économiques par exemple) pour démarrer la phase de renouvellement du peuplement. Si elle peut être accentuée par l'influence de facteurs environnementaux

locaux (compétition entre arbres (Oddou-Muratorio et al., 2005), variations édaphiques intra-parcelles), elle peut s'expliquer par une variabilité génétique importante pour les traits liés à la reproduction (Burczyk et Prat 1997, Stoehr et al. 2004). Il est important d'apprécier son ampleur afin d'approcher la taille efficace de population souvent surestimée par l'effectif de reproducteurs présents dans l'unité de reproduction.

- *l'unité de gestion.* C'est à son niveau que sera évalué le succès de la régénération naturelle. Sa composition génétique (origine génétique, mode de régénération) et sa structure spatiale (densité : niveau et homogénéité) sont liées à son histoire sylvicole et sont des déterminants importants de la qualité des graines produites. Sur un plan méthodologique, il est difficile voire impossible de pouvoir caractériser la dynamique de la diversité génétique de façon exhaustive sur l'ensemble de cette unité de gestion qui regroupe le plus souvent plusieurs centaines d'adultes reproducteurs. La plupart des études expérimentales conduites se limitent au suivi exhaustif d'une surface significativement plus petite ou à des estimations par échantillonnages aléatoires ou stratifiés mais dans ce cas à l'échelle de populations plutôt que d'unités de gestion. La majorité des résultats de modélisation de flux de pollen et de graines disponibles aujourd'hui se rapportent à cette échelle infra-unité de gestion.

- *le voisinage reproducteur.* Ce dernier comprend non seulement les unités de gestion adjacentes mais aussi les individus provenant de parcelles plus éloignées et participant à la régénération à la faveur d'évènements de dispersion (pollen ou graines) à grande distance. Dans le chapitre IV s'intéressant au flux de pollen, nous avons vu qu'il est important de le prendre en compte, tout particulièrement lorsque la taille efficace de l'unité de gestion est réduite et que la production de pollen devient limitante. Il convient non seulement de caractériser ce voisinage par sa taille mais aussi par son caractère continu (cas de massifs où le pin sylvestre est l'essence majoritaire) ou dispersé (peuplements isolés ou fragmentés au sein d'un massif). Il faut souligner ici que le voisinage est très rarement décrit dans les études reportées dans la littérature.

Si ces échelles sont emboîtées les unes dans les autres, il est difficile d'isoler la contribution spécifique de chacune d'entre elles au résultat final. Nous avons pu montrer par exemple dans le chapitre IV (Forêt d'Orléans) qu'en situation de peuplement isolé, la densité locale de reproducteurs avait un effet significatif sur le taux de graines pleines d'un individu. A densité locale comparable dans le massif de Haguenau, cette relation n'a pu être mise en évidence, la quantité de pollen produite n'étant probablement pas limitante dans ce grand massif continu à forte présence de pins sylvestres. La diversité des résultats expérimentaux

rapportés sur l'importance des flux de pollen à moyenne et longue distance pourrait ainsi s'expliquer par l'intervention simultanée de facteurs liés à ces trois échelles spatiales. Il est cependant très rare de disposer d'une description précise de l'ensemble de l'unité de reproduction qui faciliterait la comparaison entre études.

Bien que l'organisation spatiale à plusieurs échelles de l'unité de reproduction soit probablement un des éléments les plus importants à prendre en compte dans la compréhension du fonctionnement des populations d'arbres forestiers, la dimension temporelle ne doit pas être négligée. Nous avons vu, dans le chapitre IV, que le niveau de recrutement de jeunes semis était très lié au niveau moyen de production de graines de l'unité de gestion. De plus, dans des populations isolées, et donc sans apport possibles de graines ou de pollen du voisinage reproducteur, la forte variabilité interannuelle pour les caractéristiques de floraison / fructification apparaît avoir une influence déterminante sur la dynamique de la population. Il n'en reste pas moins que dans le cas de larges populations formant un massif compact, les fortes variations interannuelles observées sur les quantités de graines produites devront conduire à une programmation de la mise en régénération pour maximiser les chances de réussites de l'opération.

1.2 Compléter l'étude du régime de reproduction dans des situations de peuplements fragmentés

Alors que les études de flux de gènes dans des situations de massif continu sont relativement nombreuses (Burczyk et al., 1996 ; Streiff et al., 1999 ; de-Lucas et al., 2008), elles sont plus rares en revanche dans des situations fragmentées (Robledo-Arnuncio et Gil, 2005 ; Xie et Knowles, 1994 ; Schuster et Mitton, 2000). Il est important de souligner ici que l'extrapolation aux situations fragmentées des résultats acquis en massifs continus paraît difficile, plusieurs composantes décrivant le régime de reproduction étant différentes. En massif continu, la production de pollen semble rarement limitante et la taille de l'unité de production permet une plus grande homogénéisation des nuages polliniques conduisant à un meilleur brassage génétique et à une augmentation du nombre potentiel de pères par arbre. Il apparaît donc important de continuer à identifier et hiérarchiser les déterminants des flux de gènes en situations de peuplements fragmentés ou lorsque les niveaux de production de pollen ou de graines deviennent limitants.

En matière de gestion de la diversité génétique, plusieurs formes de fragmentation sont intéressantes à considérer :

- la fragmentation de l'unité de reproduction dans les *peuplements mixtes* dans lesquels la contribution relative du pin sylvestre peut être variable. A l'avenir, les peuplements mixtes seront probablement prépondérants, étant donnée leur meilleure capacité de résilience à des événements climatiques extrêmes de plus en plus fréquents (Lygis et al., 2004; Simard et Payette, 2005). Une validation des résultats acquis en forêt d'Orléans sur plusieurs années successives et dans d'autres parcelles aux structures de mélange différentes est souhaitable. Il conviendrait dans un premier temps de pouvoir compléter l'approche phénotypique réalisée par une approche génétique caractérisant le niveau et la structuration de la diversité génétique dans des petits îlots de pins issus eux-mêmes de régénération naturelle et quantifiant les contributions parentales dans la pluie de graines.

- la fragmentation de l'unité de reproduction par *l'origine génétique* du matériel. De nombreux massifs forestiers de plaine où le pin sylvestre a été introduit sont des mosaïques de peuplements d'origines géographiques et génétiques parfois bien différenciées pour leur capacités de reproduction et leur phénologie florale (Bobowicz, 1993 ; Bobowicz et Korczyk, 1994 ; Bougeard et Hue 2006a). Si l'importance des flux de pollen à moyenne et longue distance permet d'attendre une participation de l'ensemble des pools génétiques à l'évènement de reproduction, il reste impossible de prédire les contributions relatives de chacun d'entre eux. Pour cela, il faudrait pouvoir disposer de marqueurs moléculaires discriminant les différentes origines, marqueurs non disponibles dans l'état actuel des connaissances. La fragmentation des origines génétiques peut être un atout dans le contexte du changement climatique, offrant ainsi la possibilité à des origines génétiques normalement éloignées de plusieurs centaines de kilomètres de s'intercroiser et ainsi d'augmenter dans la population locale la fréquence d'allèles favorables présents dans des populations plus méridionales (Lindner et al., 2008). L'intérêt d'une infusion modérée d'allèles nouveaux dans l'origine locale est de maintenir les performances phénotypiques favorables du peuplement et de limiter les risques en cas de mal-adaptation du pool génétique introduit (Savolainen et al., 2007). Compte tenu de la rapidité attendue des changements et de la longueur des générations des espèces forestières, l'apport de gènes nouveaux *via* plantation artificielle au cœur de massif forestier est souvent proposé (Rehfeldt et al., 2002 ; Koskela et al., 2007).

Un deuxième type de peuplement peut entrer dans cette catégorie de fragmentation. Il s'agit des unités conservatoires *in situ* (UC), plus ou moins isolées d'autres boisements d'origine génétique différente. Il est important de connaître dans ce cas si l'unité de gestion et

les individus qui la composent déterminent en très grande majorité la qualité génétique de la graine produite et dispersée dans l'UC.

- la fragmentation de l'unité de reproduction par *l'évolution des aires de répartition* des espèces dans un contexte de changements climatiques et d'usages (Caughley, 1994 ; Kramerlin et al., 2008). Les populations naturelles espagnoles de pin sylvestre illustrent bien cette situation. Les populations marginales reliques de petites tailles se différencient des populations de plus grandes tailles en cœur de massif, non seulement par leur composition génétique (Robledo-Arnuncio et al., 2005) mais aussi par les caractéristiques de leur régime de reproduction (Robledo-Arnuncio et al., 2004b). Dans le contexte du changement climatique, les populations naturelles marginales en cours d'isolement risquent de devenir de plus en plus nombreuses. Dans le cas particulier du pin sylvestre où des unités conservatoires sont en cours d'installation dans le Sud-Est de la France, il devient urgent de suivre l'évolution de la diversité génétique actuelle en régénération naturelle pour valider l'intérêt de ces parcelles en tant qu'unité conservatoire et définir des modalités de gestion appropriées. Dans ces régions, une réduction du niveau des fructifications de plusieurs conifères est observée depuis plusieurs années et vient confirmer les observations réalisées en parc à clones de pin sylvestre dans les années suivant la canicule de 2003 (Bougeard et Hue 2006b).

Ce dernier type de fragmentation conduit à s'intéresser au fonctionnement reproductif des populations à une échelle encore plus grande que celle évoquée jusqu'ici en s'intéressant aux flux de gènes à très grande distance qui ne participent quantitativement que très faiblement à la mise en place d'une régénération naturelle mais qui contribuent significativement à l'évolution à long terme de la diversité génétique des espèces (Lenormand, 2002). On se trouve alors confronté à un problème de description de cette large unité de reproduction, celle-ci devenant généralement de plus en plus hétérogène et difficile à décrire. Une discipline récente, la génétique du paysage ou 'Landscape genetics' (Manel et al., 2003 ; Storfer et al., 2007) démontre d'ailleurs l'intérêt d'étudier le fonctionnement des populations à l'échelle du paysage. Connaître l'impact de la structure du paysage sur la connectivité ou l'isolement des populations, permet d'apporter un nouveau regard sur des processus biologiques fondamentaux tels que le fonctionnement des métapopulations, la spéciation ou la définition de l'aire de distribution des espèces (Storfer et al., 2007). D'un point de vue plus appliqué, cela peut permettre d'identifier les barrières aux flux de gènes et au maintien de la diversité génétique, de prédire les effets des pratiques sylvicoles à l'échelle du massif sur la diversité génétique, et de mettre en évidence les 'corridors' qui peuvent participer à la conservation de la diversité génétique.

1.3 Gestion de la diversité neutre et de la diversité adaptative

Le travail réalisé dans cette thèse vise à caractériser la dynamique de la diversité génétique de différentes populations en utilisant les outils de génétique des populations. Seuls des marqueurs moléculaires neutres ont été utilisés. De plus les suivis de l'évolution temporelle des caractéristiques génétiques (neutres) d'une population de semis naturels n'ont porté que sur les quatre premières années suivant leur installation. Il convient donc de souligner l'importance de réaliser :

- un travail complémentaire de suivi démographique et génétique de cette population de semis dans laquelle la compétition commence à exercer une pression de sélection, et ce avant la première intervention du sylviculteur sous forme de dépressions. Au sein des écosystèmes forestiers, les arbres entrent en compétition pour différents facteurs tels que la lumière, l'eau ou les nutriments et cette compétition affecte leur croissance et leur survie (Wyckoff et Clark 2005). Parmi ces ressources, la lumière est considérée comme la plus importante (Roussel, 1953 ; Cannell et Grace, 1993 ; Pacala et al., 1994 ; Brunner, 1998 ; Mac Farlane et al., 2000) et serait reconnue comme un des principaux facteurs pilotant les dynamiques des écosystèmes forestiers (Clark et Clark, 1992 cité dans Wyckoff et Clark, 2005) grâce aux différences de réponse à la compétition pour la lumière (Pacala et al., 1994 ; Lin et al., 2001). En situation pédoclimatique non limitante (au moins à des stades juvéniles), la compétition pour la lumière va s'exacerber avec l'âge. La poursuite du suivi démogénétique entamé permettrait alors de quantifier l'intensité de la purge de sélection pratiquée, notamment sur différents niveaux d'apparentement dans les taches de régénération naturelle, et ce jusqu'à la première intervention sylvicole. Un travail sur l'influence de la lumière et la compétition par les adventices (molinie, callune...) sur la survie et la croissance de jeunes plantules de pin sylvestre est en cours de réalisation au Cemagref de Nogent sur Vernisson (Thèse Noémie Gaudio).
- un travail supplémentaire de suivi de diversité génétique de traits adaptatifs et de production, ces derniers pouvant être soumis aux pressions de sélection rencontrées localement. Cette étape consisterait à quantifier les intensités de sélection phénotypique et finalement génétique pratiquées par le sylviculteur sur différents caractères d'intérêt lors des prélèvements successifs qui vont façonner le nouveau peuplement et notamment lors du choix final des reproducteurs dans l'unité de gestion.

Enfin, l'évaluation en tests en forêt de croisements contrôlés entre pools génétiques différenciés susceptibles de s'hybrider naturellement pourrait également participer à une réflexion plus large sur l'évolution des performances phénotypiques de mosaïques d'origines génétiques.

2. Conseils pour une gestion de la diversité génétique du pin sylvestre conduit en régénération naturelle

La régénération naturelle est un mode de renouvellement des peuplements forestiers largement utilisé en Europe. Elle est considérée comme le garant du maintien de la diversité génétique disponible localement et des capacités adaptatives du peuplement futur (Nanson et al., 1991 ; Hosius et al., 2006). Ce mode de renouvellement imite le processus naturel de fonctionnement des écosystèmes forestiers dans les phases de dispersion initiale des individus et de sélection naturelle entre les stades semis et jeunes arbres, mais aussi en permettant les interactions avec les autres composantes de l'écosystème. Il est en outre souvent préféré à la plantation pour des raisons de coûts et d'impacts paysagers.

La maîtrise de ce mode de renouvellement s'avère cependant plus délicate qu'il n'y paraît. En effet, les conséquences des choix sylvicoles sur le régime de reproduction et sur les flux de gènes, qui affectent les paramètres génétiques de la régénération (diversité, apparentement, structure spatiale), demeurent encore mal connues des gestionnaires. En outre, l'évolution à la fois démographique et génétique de la régénération naturelle reste encore une véritable « boîte noire ». Les contributions de cette thèse sont déclinées ici en suivant un cycle sylvicole complet intégrant un scénario régénération naturelle.

2.1 Dresser l'état des lieux du peuplement : qualité phénotypique, diversité génétique et voisinage reproducteur

Pour un gestionnaire forestier confronté au renouvellement d'un peuplement, la première étape du processus de décision consiste à évaluer la qualité phénotypique de ce peuplement. Sauf choix dûment assumé de renouveler un boisement de médiocre qualité (par souci d'autochtonie par exemple, ou faute de moyens financiers), la régénération naturelle est généralement associée à une qualité phénotypique jugée suffisante. Si au contraire cette qualité est jugée médiocre, la régénération artificielle s'impose et la gestion des ressources

génétiques se limite alors au choix de l'espèce, de la provenance ou de la variété forestière améliorée à mobiliser.

Si la qualité phénotypique du peuplement parvenu à maturité est considérée de niveau suffisant pour mettre en œuvre une régénération naturelle dans l'unité de gestion correspondante, il faut alors replacer cette unité dans son contexte forestier. La caractérisation de la composition en espèces et en origines géographiques (intra espèce) des unités de gestion voisines, voire du massif forestier dans sa totalité, permet d'évaluer le degré d'isolement du boisement à régénérer vis-à-vis des flux de gènes.

- *Clarifier les objectifs de gestion des ressources génétiques*

Les résultats de cette thèse montrent, en situation de massif de grande taille et à forte présence de pin sylvestre (type Haguenau) :

- une absence de différentiation des nuages polliniques des arbres mères, qui peut être expliquée par la présence d'un vaste pool de pollen issu des contributions des très nombreux arbres florifères du massif, toutes origines confondues.
- l'importance des apports polliniques à des distances dépassant les dimensions habituelles d'une unité de gestion de quelques hectares. Un massif (de type Haguenau ou même de type Orléans) étant généralement composé de peuplements d'origines variées et inconnues, les flux de pollen à longue distance peuvent donc mettre en contact des individus d'origines diverses qu'elles soient autochtones ou allochtones.
- le maintien d'une diversité génétique neutre élevée même dans les unités de gestion comportant une très faible densité de reproducteurs (<15 tiges/ha). Ces derniers bénéficient en effet des contributions de nombreux pères extérieurs à l'unité de gestion.
- une faible structuration spatiale de la diversité génétique dans la population adulte compte tenu des distances moyennes entre arbres au moment de la mise en régénération.

Dans ces conditions, une gestion forestière qui tient compte de l'ampleur et de l'échelle du phénomène biologique que constituent les flux de pollen ne doit donc plus réfléchir les stratégies de conduite de peuplements à l'échelle de l'unité de gestion mais plutôt à celle de l'unité de reproduction. Dans un paysage forestier comme celui du massif de Haguenau, la clarification des objectifs de gestion des ressources génétiques du pin sylvestre devient indispensable à une échelle spatiale dépassant l'unité de gestion. Si le gestionnaire du massif

de Haguenau choisit de donner la priorité à la conservation *in situ* d'une ressource génétique ayant fait la preuve de sa valeur agronomique, il va se heurter à deux difficultés majeures : i) l'âge avancé des plus anciens peuplements autochtones qui ne permet pas une bonne production de pollen et favorise donc les flux de pollen extérieurs probablement d'origine non autochtone, ii) la fragmentation des unités de gestion autochtones au sein d'un massif multi-origines. Pour préserver les caractéristiques génétiques de tout ou partie des peuplements autochtones âgés qui subsistent encore, en choisissant de les renouveler par régénération naturelle, il lui faudra donc définir les conditions qui limiteront fortement les flux de pollen extérieurs en provenance d'unités de gestion d'origine non souhaitée ou inconnue. Le gestionnaire pourra alors choisir une des deux options suivantes :

- ne retenir le mode de renouvellement par régénération naturelle que pour les rares ensembles compacts d'unités de gestion autochtones ou anticiper fortement la mise en régénération de ces îlots de pin sylvestre autochtones (surtout ceux à faible densité de tiges) en renouvelant d'abord les unités de gestion riveraines sous forme de plantations issues de la seule source de graines garantie autochtone que constitue le verger à graines Haguenau (Haguenau-Vayrière-VG). La création de ces véritables zones tampon autochtones constituera alors un filtre naturel protégeant les îlots autochtones et contribuant également par sa propre production de pollen à diluer les apports extérieurs d'origines diverses toujours possibles.
- renouveler systématiquement les unités de gestion autochtones, en priorité celles de petite taille, voire même des unités de gestion issues d'origine non autochtone, uniquement sous la forme de plantations de MFR provenant du verger à graines Haguenau, opération qui conduirait en outre à augmenter, à terme, les contributions polliniques de cette origine dans le pool de pollen du massif.

La mise en place de l'une ou l'autre de ces stratégies suppose toutefois une prise en compte effective de la gestion des ressources génétiques dans les choix sylvicoles à court, moyen et long terme : choix des MFR lors des plantations, planification des mises en régénération, orientations générales de l'aménagement forestier.

A l'inverse, dans un massif multi-origines situé hors zone d'autochtonie comme la forêt d'Orléans, représentative de nombreuses pineraies artificielles de plaine, l'intensité des flux de pollen entre unités de gestion d'origines diverses peut être recherchée et valorisée par le gestionnaire qui cherchera alors à élargir et diversifier la base génétique de ses nouveaux peuplements à chaque opération de régénération naturelle. L'ampleur des flux de pollen

pourra cependant s'avérer pénalisante si certaines des origines géographiques de pin sylvestre introduites présentent une qualité phénotypique médiocre ou une mauvaise adaptation aux conditions pédoclimatiques du massif ou encore si la recombinaison génétique entre origines différencierées conduit à une perte des performances adaptatives et de production.

- *Evaluer le degré d'isolement en peuplement mélangé ou fragmenté*

L'analyse des déterminants de la production de graines en situation de pineraie isolée dans un massif composé majoritairement d'autres taxons non interfertiles (type massif d'Ingrannes en FD d'Orléans) met en évidence le risque d'une limitation de la production de graines pleines en raison d'une ressource en pollen limitée. L'absence ou la faiblesse des apports polliniques extérieurs ne peut en outre compenser une éventuelle faible diversité génétique du peuplement reproducteur isolé. Tel pourrait être le cas pour les îlots de pin sylvestre introduits au XIX^{ème} siècle dans les vides des boisements feuillus dégradés de la FD d'Orléans. La majeure partie des îlots de pin sylvestre actuels correspondant en outre à une seconde génération, une base génétique initiale très réduite et des effectifs limités augmentent le risque de consanguinité, ce qui pourrait expliquer en partie les forts taux de graines vides observés sur le site d'Ingrannes. Cette limitation dans la disponibilité en semences est elle-même aggravée par les capacités de dispersion limitées des graines de pin sylvestre à partir d'autres pineraies, relativement distantes dans un massif fragmenté en pin sylvestre comme celui d'Ingrannes. Les seules zones où une contribution significative à la production de graines depuis les parcelles alentour peut être espérée, se situent dans une ceinture de 50 m de large autour des limites de la parcelle. Faute d'apports significatifs de graines depuis les peuplements alentour, le gestionnaire devra alors compter principalement sur son unité de gestion comme seule source possible de graines et donc de semis.

- *Evaluer les capacités de production de graines*

L'irrégularité des fructifications du pin sylvestre est bien connue des gestionnaires et a été rapportée par plusieurs auteurs (Karlsson et Örlander, 2000 ; Hilli et al., 2008). Quel que soit le degré d'isolement de la pineraie à régénérer, l'évaluation de l'abondance des fructifications constitue donc un point incontournable dans l'état des lieux que doit dresser le gestionnaire avant tout déclenchement d'une régénération naturelle. Nos observations ont montré qu'une estimation pertinente de la production globale de semences du peuplement à régénérer pouvait être obtenue par l'observation visuelle de l'abondance de cônes. Sur le plan technique, il faudrait privilégier l'observation des houppiers chez plusieurs groupes

d'individus plutôt que de répartir l'effort d'observation sur un nombre total identique d'arbres dispersés au sein du boisement. Chez le pin sylvestre, la réalisation du cycle reproductif sur deux années et une dégradation relativement lente des cônes ouverts tombés au sol permettent d'estimer en un seul passage le niveau de fructification atteint les années $n-1$ et n et celui attendu pour l'année $n+1$. Ce mode d'observation permet en outre de mettre en évidence une éventuelle structuration spatiale de la fructification qui affecterait alors directement la mise en place de la régénération naturelle dans les zones à faible niveau de fructification.

2.2 La sélection des arbres semenciers

Le choix de la régénération naturelle étant acté, la deuxième étape de la conduite du peuplement est la sélection des arbres semenciers qui vont participer à la génération suivante. Le choix de ces arbres est d'une importance considérable puisque non seulement ils vont participer majoritairement au pool de graines qui sera à l'origine de la génération suivante, mais aussi parce que leur distribution spatiale va déterminer l'abondance et la distribution spatiale de la régénération naturelle.

Dans un peuplement relativement isolé (la parcelle 951 de la FD d'Orléans), nous avons mis en évidence que les pins sylvestres placés en situations de faible densité de congénères (cas des peuplements mélangés avec une distribution irrégulière) produisent individuellement moins de graines pleines que des individus situés dans une zone dense en pins. En revanche, au cœur d'un massif riche en pins (Haguenau), la densité locale en pins autour d'un semencier pin ne constitue pas un facteur déterminant de la production individuelle de graines pleines. Dans les peuplements mixtes chênes-pin isolés, la mise en régénération naturelle doit donc être évitée lorsque le compartiment pin est composé uniquement d'arbres épars ou de bouquets de quelques tiges seulement. Dans ce cas, le seul moyen de maintenir le mélange d'espèces est l'apport de matériel végétal par plantation. Au contraire lorsque le peuplement mixte présente une structure en patch et/ou lorsque ce peuplement n'est pas isolé d'autres boisements importants de pins florifères, la production de graines est limitée essentiellement par les seules variations individuelles et interannuelles de floraison/fructification ; dans ce cas, l'estimation de la capacité de production de graines par observation de l'abondance de cônes doit être réalisée avant toute coupe d'ensemencement.

Etant donné le fort déterminisme génétique des caractères liés à la reproduction, la sélection des arbres semenciers devra combiner capacité reproductrice et valeur phénotypique

pour des critères d'intérêts sylvicole. Les 'bons reproducteurs' conservant leur classement à la fois les bonnes et les mauvaises années, leur contribution à la régénération constitue un atout pour le gestionnaire, notamment quand cette phase de renouvellement s'étale sur plusieurs années. L'estimation simultanée aux niveaux de fructifications de trois années successives (n-1, n et n+1) facilite également l'identification des meilleurs semenciers.

Enfin, vue la faible capacité de dispersion des graines, la sélection des semenciers de pin sylvestre conditionnera fortement l'emplacement des futures taches de régénération. En cas de répartition irrégulière des pins adultes en peuplement mixte, le mélange d'espèces à la génération suivante ne pourra être acquis sur l'ensemble de l'unité de gestion, sauf si des compléments par plantation sont réalisés.

2.3 Dispersion des graines et stratégies de régénération

La dispersion des graines constitue une étape supplémentaire des flux de gènes, qui permet de passer d'un flux de graines potentiel à un flux de graines réalisé. Elle conditionne la répartition de la régénération naturelle et sa structure spatiale. Pour cette étape il convient de distinguer deux situations : les futaies pures à structure régulière avec des arbres répartis sur l'ensemble de l'unité de gestion, et les peuplements mélangés ou dégradés où la distribution des individus dans l'espace est irrégulière (îlots et/ou individus isolés).

Lorsque les pins sont répartis régulièrement dans l'espace en peuplement mono spécifique, le recouvrement des fenêtres de dispersion dépendra d'abord de la densité des semenciers retenus. En s'assurant par ailleurs que tous ces adultes présentent un niveau élevé de fructification, le gestionnaire évitera des contributions déséquilibrées à la régénération, qui pourraient d'une part conduire à des manques dans la couverture de l'unité de gestion par les futurs semis et d'autre part engendrer un apparentement plus fort de la régénération à proximité des quelques forts contributeurs. Ce critère est d'autant plus important qu'une seule bonne année de fructification suffit généralement à la mise en place de la régénération comme le démontre le suivi démo-génétique des plots de régénération dans le massif de Haguenau.

Au contraire, lorsque la répartition des arbres mères n'est pas régulière et que les îlots de reproducteurs de pins sont dispersés au sein d'un peuplement mélangé, la régénération ne peut apparaître sur l'ensemble de la parcelle mais se concentre en auréoles d'une cinquantaine de mètres autour des semenciers. L'emplacement de la régénération sera ainsi fortement

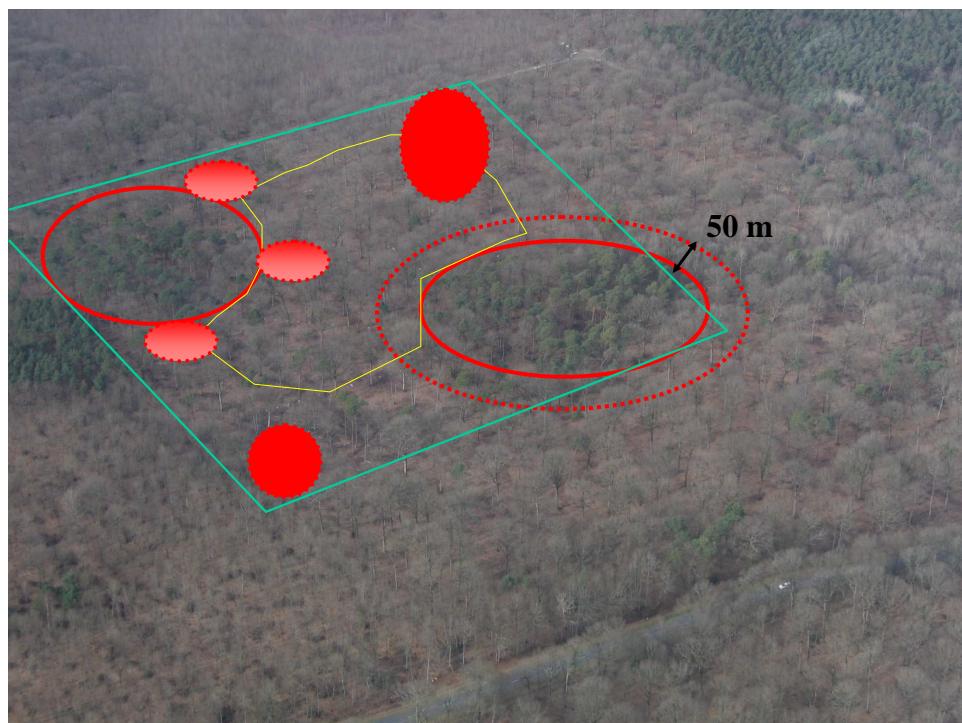


Figure VI.1 Illustration des différentes stratégies possibles d'implantation de la régénération en peuplements mixtes chêne-pin. A) élargissement des îlots adultes de pins par dissémination des graines à leur périphérie à 50m au plus (couronne en pointillé) ; B) extension des îlots adultes par création de quelques taches satellite jouxtant ces îlots (taches roses pointillé) ; C) ouverture de trouées dans le peuplement mélangé et plantation de MFR pin sylvestre (taches rouges)

contraint par la localisation des adultes. Le gestionnaire est alors confronté à deux choix sylvicoles possibles (**Figure VI.1**) :

- favoriser l'apparition de semis à proximité de chaque tache d'adultes, contribuant ainsi à augmenter, au fil des renouvellements, la taille de ces îlots qui pourraient à terme recouvrir l'ensemble de la surface de l'unité de gestion. La question est alors posée du maintien d'un mélange équilibré d'espèces dans l'unité de gestion.
- concentrer de manière volontariste l'apparition de semis sur une partie seulement de la périphérie des îlots de pins, sous la forme de quelques trouées ponctuelles. Cette option permet de limiter l'extension des zones de pins au fil des générations et donc de maintenir un mélange d'espèces par unité de gestion.

La production de graines à partir de croisements préférentiels entre pins adultes appartenant à un même îlot, couplée à une dispersion limitée de ces graines, peut engendrer la mise en place d'une structure génétique spatiale de la régénération, qui tout au long des cycles successifs de régénération naturelle, entraînera des croisements entre individus toujours plus apparentés. Ce phénomène est particulièrement important lorsque le peuplement est composé d'îlots de pins éloignés les uns des autres dans un peuplement composé majoritairement d'une ou plusieurs autres espèces non inter fertiles. Le seul moyen de limiter l'apparition d'une structure génétique spatiale marquée est alors l'introduction de matériel génétique adapté et diversifié, via la plantation ou le semis.

2.4 Travail du sol et mise en place de la régénération

Une fois définis la stratégie de mise en place de la régénération naturelle et les choix sylvicoles correspondants, le gestionnaire devra chercher à tirer le meilleur profit des productions de graines pleines et notamment en optimisant le passage de la graine au semis viable. Le travail du sol et le contrôle de la végétation adventice permettent d'augmenter considérablement le taux de germination et de survie des plantules et un travail du sol est d'autant plus efficace qu'il est réalisé juste avant une chute importante de graines. Nos observations montrent que les travaux de scarification doivent être réalisés au début du printemps (au plus tard fin Mars) en forêt d'Orléans. Ce travail du sol est d'autant plus important dans le cas de peuplements âgés à fructification modérée et irrégulière comme Haguenau pour valoriser au mieux les rares bonnes années de fructification. Optimiser la germination et la survie des semis lors de tels épisodes permet donc de réduire

considérablement la durée de la phase de régénération mais suppose une observation annuelle régulière des niveaux de fructification et une réactivité forte pour planifier et réaliser les travaux de préparation du sol et de maîtrise de la végétation adventice. Il conviendrait de ne pas limiter l'estimation de la fructification à de simples notations d'abondance de cônes mais de pouvoir accéder sur quelques échantillons à une estimation du pourcentage de graines pleines très sensibles nous l'avons vu à la qualité de la pollinisation l'année précédente.

Une fois acquise la régénération naturelle, les différentes interventions sylvicoles successives (dépressions, éclaircies) vont affecter la structure spatiale de la nouvelle population de pins en modifiant les densités locales de pins. Ces choix sont d'autant plus importants dans les peuplements mélangés où les interventions sylvicoles peuvent façonner la structure du mélange en privilégiant par exemple soit la mise en place d'agrégats mono spécifiques soit une juxtaposition pied à pied des tiges des diverses espèces soit une combinaison des deux. Lorsque la structure spatiale du peuplement reproducteur ne permet pas d'obtenir le type de mélange recherché à la génération suivante, la plantation peut constituer une solution technique pertinente. Lorsque les pins sont minoritaires dans un peuplement mélangé (cas de mélanges pied à pied chêne-pin ou présence de bouquets de quelques pins seulement), la mise en place d'une régénération naturelle est déconseillée (voir ci-dessus § 13) et seule la création artificielle d'îlots de pins par plantation peut permettre de créer une structure mélangée chêne-pin qui pourra être pérennisée à la génération suivante. Des apports de MFR extérieurs raisonnés pourront par ailleurs augmenter la diversité génétique de la population de pins et ses capacités d'adaptation.

Bibliographie

-- A --

- 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.
- ADAMS, W. T. (1992). Gene dispersal within forest tree populations. New Forests 6, 217-240.
- AGESTAM, E., KARLSSON, M. & NILSSON, U. (2005). Mixed forests as a part of sustainable forestry in southern Sweden. Journal of Sustainable Forestry 21, 101-117.
- AHO, M. L. (1994). Autumn Frost Hardening of One-Year-Old *Pinus-Sylvestris* (L) Seedlings - Effect of Origin and Parent Trees. Scandinavian Journal of Forest Research 9, 17-24.
- AITKEN, S. N., YEAMAN, S., HOLLIDAY, J. A., WANG, T. & CURTIS-MCLANE, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: Climate change outcomes for tree populations. Evolutionary Applications 1, 95-111.
- ALAZARD, P. & RAFFIN, A. (2002). L'amélioration génétique du pin maritime en Aquitaine: des gains génétiques toujours plus importants. Forêt Entreprise 148, 23-30.
- AUCKLAND, L.D, BUI, T., ZHOU, Y., SHEPHERD, M. & WILLIAMS, C.G. (2002) Conifer microsatellite handbook. Corporate Press, Raleigh, N.C.
- AUSTERLITZ, F., MARIETTE, S., MACHON, N., GOUYON, P. H. & GODELLE, B. (2000). Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species. Genetics 154, 1309-1321.
- AUSTERLITZ, F. & SMOUSE, P. E. (2001). Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. III. Impact of adult population structure. Genetical Research 78, 271-280.
- AUSTERLITZ, F. & GARNIER-GERE, P. H. (2003). Modelling the impact of colonisation on genetic diversity and differentiation of forest trees: interaction of life cycle, pollen flow and seed long-distance dispersal. Heredity 90, 282-290.
- AUSTERLITZ, F., DICK, C. W., DUTECH, C., KLEIN, E. K., ODDOU-MURATORIO, S., SMOUSE, P. E. & SORK, V. L. (2004). Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. Molecular Ecology 13, 937-954.

-- B --

- BACLES, C. F. E., BURCZYK, J., LOWE, A. J. & ENNOS, R. A. (2005). Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. *Evolution* 59, 979-990.
- BARTOLI, M. & DEMESURE-MUSCH, B. (2003). Plus d'un siècle d'intervention humaine dans les flux de gènes des pins à crochet et Sapins Français. *Revue Forestière Française* 55, 543-556.
- BEAULIEU, J. & SIMON, J. P. (1995). Mating system in natural populations of eastern white pine in Quebec. *Canadian Journal of Forest Research* 25, 1697-1703.
- BELAND, M., AGESTAM, E., EKO, P. M., GEMMEL, P. & NILSSON, U. (2000). Scarification and seedfall affects natural regeneration of Scots pine under two shelterwood densities and a clear-cut in southern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 15, 247-255.
- BERG, E. E. & HAMRICK, J. L. (1995). Fine-scale genetic structure of a turkey oak forest. *Evolution* 49, 110-120.
- BILA, A. D. (2000). Fertility variation and its effects on gene diversity in forest tree populations. In *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae - Silvestria*.
- BIROT, Y. & LACAZE, J. F. (1981). Choix des sources de graines de pin sylvestre. *Revue Forestière Française* XXXIII, 187-194.
- BITTENCOURT, J. V. M. & SEBBENN, A. M. (2007). Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99, 580-591.
- BITTENCOURT, J. V. M. & SEBBENN, A. M. (2008). Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TwoGENER analysis. *Conservation Genetics* 9, 855-868.
- BLADE, C. & VALLEJO, V. R. (2008). Seed mass effects on performance of *Pinus halepensis* Mill. seedlings sown after fire. *Forest Ecology and Management* 255, 2362-2372.
- BOBOWICZ, M. A. (1993). Intrapopulational variability of *Pinus sylvestris* L. from Piekielna Gora in respect to cone and needle traits. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 62, 131-136.
- BOBOWICZ, M. A. & KORCZYK, A. F. (1994). Variability of eight Polish populations of *Pinus sylvestris* L. expressed in traits of cones. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 63, 191-198.
- BORATYNSKI, A., BORATYNSKA, K., LEWANDOWSKI, A., GOAB, Z. & KICINSKI, P. (2003). Evidence of the possibility of natural reciprocal crosses between *Pinus sylvestris* and *P. uliginosa* based on the phenology of reproductive organs. *Flora* 198, 377-388.
- BOUCHET, G. (2007). L'hybridation entre *Pinus sylvestris* L.(Pin sylvestre) et *Pinus uncinata* Ram. (Pin à crochets) dans les Pyrénées Françaises : importance du

- phénomène et rôle du synchronisme de floraison en conditions naturelles. ENITAB, Mémoire de fin d'études, 38p + annexes.
- BOUGEARD, M. & HUE, A. (2006a). Variabilité génétique des fonctions de reproduction du pin sylvestre : Impact des conditions climatiques de l'année 2003 sur la fructification du Pin sylvestre. Poster, Master I , Université Orléans.
- BOUGEARD, M. & HUE, A. (2006b). Variabilité génétique des fonctions de reproduction du pin sylvestre : Caractéristiques des floraisons mâle et femelle dans deux populations de pin sylvestre. Poster, Master I , Université Orléans.
- BOUSSAID, O. (2008). Qualité génétique d'une régénération naturelle de Douglas vert, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. Mémoire de Master II EТАH, Université d'Orléans. INRA Orléans-CGAF, 30p.
- BRG. (1997). Chartre pour la conservation des ressources génétiques des arbres forestiers en France. http://www.brg.prd.fr/brg/pages/les_rg_en_france/rgv_arbresForestiers.php.
- BROWN, A. H. D. (1990). Genetic characterization of plant mating systems. In Plant population genetics, breeding, and genetic resources. ed. A.H.D. BROWN, M. T. C., A.L. KAHLER AND B.S. WEIR, pp. 145-162. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- BRUNNER, A. (1998). A light model for spatially explicit forest stand models. *Forest Ecology and Management* 107, 19-46.
- BURCZYK, J. (1996). Variance effective population size based on multilocus gametic frequencies in conifer populations: an example of a Scots pine clonal seed orchard. *Heredity* 77, 74–82.
- BURCZYK, J., ADAMS, W. T. & SHIMIZU, J. Y. (1996). Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. *Heredity* 77, 251-260.
- BURCZYK, J. & CHALUPKA, W. (1997). Flowering and cone production variability and its effect on parental balance in a Scots pine clonal seed orchard. *Annales des Sciences Forestieres* 54, 129-144.
- BURCZYK, J., NIKKANEN, T. & LEWANDOWSKI, A. (1997). Evidence of an unbalanced mating pattern in a seed orchard composed of two larch species. *Silvae Genetica* 46, 176-181.
- BURCZYK, J. L. & PRAT, D. (1997). Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) France: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity* 79, 638-647.
- BURCZYK, J., DIFAZIO, S. P. & ADAMS, W. T. (2004). Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? *Forest Genetics* 11, 179-192.
- BURCZYK, J., ADAMS, W. T., BIRKES, D. S. & CHYBICKI, I. J. (2006). Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. *Genetics* 173, 363-372.

BYRAM, T. D., LOWE, W. J. & MCGRIFF, J. A. (1986). Clonal and annual variation in cone production in loblolly pine seed orchards. *Forest Science* 32, 1067-1073.

-- C --

CAMARERO, J. J., GUTIERREZ, E., FORTIN, M. J. & RIBBENS, E. (2005). Spatial patterns of tree recruitment in a relict population of *Pinus uncinata*: forest expansion through stratified diffusion. *Journal of Biogeography* 32, 1979-1992.

CANHAM, C. D. & URIARTE, M. (2006). Analysis of neighborhood dynamics of forest ecosystems using likelihood methods and modeling. *Ecological Applications* 16, 62.

CANNELL, M. G. R. & GRACE, J. (1993). Competition for light: detection, measurement, and quantification. *Canadian Journal of Forestry Research* 23, 1969-1979.

CARON, G. E. (1987). Pollen monitoring in two black spruce seedling seed orchards. *Fraser Inc.*, Edmonston, N.B.

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.

CASTRO, J. (1999). Seed mass versus seedling performance in Scots pine: a maternally dependent trait. *New Phytologist* 144, 153-161.

CASTRO, J., GOMEZ, J. M., GARCIA, D., ZAMORA, R. & HODAR, J. A. (1999). Seed predation and dispersal in relict Scots pine forests in southern Spain. *Plant Ecology* 145, 115-123.

CASTRO, J., ZAMORA, R., HÓDAR, J. A. & GÓMEZ, J. M. (2004). Seedling establishment of a boreal tree species (*Pinus sylvestris*) at its southernmost distribution limit: consequences of being in a marginal Mediterranean habitat,. *Journal of Ecology* 92, 266-277.

CATALAN, G. (1991). Las regiones de procedencia de *Pinus sylvestris* L. y *Pinus nigra* Arn. subsp. *salzmannii* (Dunal) Franco en España. In ICONA, Madrid, Spain.

CAUGHLEY, G. (1994). Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology* 63, 215-244.

CHABAUD, L. & NICOLAS, L. Guide des pineraies des plaines du Centre et du Nord-Ouest. Document ONF, A paraître.

CHAGNE, D., CHAUMEIL, P., RAMBOER, A., COLLADA, C., GUEVARA, A., CERVERA, M.T., VENDRAMIN, G.G, GARCIA, V., FRIGERO, J.M., ECHT, C. & RICHARDSON, T. (2004) Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics* 109,1204-1214.

- CHEDDADI, R., VENDRAMIN, G. G., LITT, T., FRANCOIS, L., KAGEYAMA, M., LORENTZ, S., LAURENT, J. M., DE BEAULIEU, J. L., SADORI, L., JOST, A. & LUNT, D. (2006). Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. *Global Ecology and Biogeography* 15, 271-282.
- CHYBICKI, I. J., DZIALUK, A., TROJANKIEWICZ, M., SLAWSKI, M. & BURCZYK, J. (2008). Spatial Genetic Structure Within Two Contrasting Stands of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genetica* 57, 193-202.
- CLARE, L. R. (1982). Assessment of pollen contamination in Pacific Forest Products' high-elevation seed orchard. In Faculty of Forestry. University of British Columbia, Vancouver.
- CLARK, C. J., POULSEN, J. R., LEVEY, D. J. & OSENBERG, C. W. (2007). Are plant populations seed limited? A critique and meta-analysis of seed addition experiments. *American Naturalist* 170, 128-142.
- CLARK, J. S. (1993). Paleoecological perspectives on modeling broad-scale responses to global change. In Biotic interactions and global change. ed. P. KAREIVA, J. G. K., AND R. B. HUEY, pp. 315–332. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- CLARK, J. S. (1998). Why trees migrate so fast: confronting theory with dispersal biology and the paleorecord. *American Naturalist* 152, 204-224.
- CLARK, J. S., MACKLIN, E. & WOOD, L. (1998). Stages and spatial scales of recruitment limitation in southern Appalachian forests. *Ecological Monographs* 68, 213.
- CLARK, J. S., BECKAGE, B., CAMILL, P., CLEVELAND, B., HILLERISLAMBERS, J., LICHTER, J., MCLACHLAN, J., MOHAN, J. & WYCKOFF, P. (1999a). Interpreting recruitment limitation in forests. *American Journal of Botany* 86, 1-16.
- CLARK, J. S., SILMAN, M., KERN, R., MACKLIN, E. & HILLERISLAMBERS, J. (1999b). Seed dispersal near and far: Patterns across temperate and tropical forests. *Ecology* 80, 1475-1494.
- CLIFF, A. D. & ORD, J. K. (1981). Spatial processes: Models and applications. Pion Ltd, London.
- CLOUTIER, D., HARDY, O. J., CARON, H., CIAMPI, A. Y., DEGEN, B., KANASHIRO, M. & SCHOEN, D. J. (2007). Low inbreeding and high pollen dispersal distances in populations of two Amazonian forest tree species. *Biotropica* 39, 406-415.
- CRIES. (1869). Cartes de la Forêt d'Orléans.
- CRITCHFIELD, W. B. & LITTLE, E. L. (1966). Geographic distribution of the pines of the world. U.S.D.A. Forest Service Miscellaneous Publication 991.
- CUCULEANU, V., TUINEA, P. & BALTEANU, B. (2002). Climate change impacts in Romania: Vulnerability and adaptation options. *GeoJournal* 57, 203-209.

-- **D** --

- DE GROOT, R. S., KUIKMAN, P. J., PLATTEEUW, M., TASSONE, V. C., VERHAGEN, A. J. A. & VERZANDVOORT-VAN DIJCK, S. (2006). Climate adaptation in the Netherlands. In Netherlands Programme Scientific Assessment and Policy Analysis Climate Change.
- DEBAIN, S., CURT, T. & LEPART, J. (2003a). Seed mass, seed dispersal capacity, and seedling performance in a *Pinus sylvestris* population. *Ecoscience* 10, 168-175.
- DEBAIN, S., CURT, T., LEPART, J. & PREVOSTO, B. (2003b). Reproductive variability in *Pinus sylvestris* in southern France: implications for invasion. *Journal of Vegetation Science* 14, 509-516.
- DEBAIN, S., CHADOEUF, J., CURT, T., KUNSTLER, G. & LEPART, J. (2007). Comparing effective dispersal in expanding population of *Pinus sylvestris* and *Pinus nigra* in calcareous grassland. *Canadian Journal of Forest Research* 37, 705-718.
- DE-LUCAS, A. I., ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J., HIDALGO, E. & GONZALEZ-MARTINEZ, S. C. (2008). Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. *Heredity* 100, 390-399.
- DODD, M. E. & SILVERTOWN, J. (2000). Size-specific fecundity and the influence of lifetime size variation upon effective population size in *Abies balsamea*. *Heredity* 85, 604-609.
- DOMET, P. (1862). *Histoire de la forêt d'Orléans*.
- DOW, B. D. & ASHLEY, M. V. (1996). Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5, 615-627.
- DOW, B. D. & ASHLEY, M. V. (1998). Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *New Forests* 15, 161-180.
- DUCHAUFOUR, P. (1947). *Le sol et la flore forestière*. *Revue des Eaux et Forêts* 85, 13-38.
- DYER, R. J. & SORK, V. L. (2001). Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Molecular Ecology* 10, 859-866.
- DYER, R. (2002). Pollen dispersal in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. in the Missouri Ozarks. Ph.D. Dissertation. University of Michigan, St. Louis.

-- **E** --

- ECHT, C. S., DEVERNO, L. L., ANZIDEI, M. & VENDRAMIN, G. G. (1998). Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Molecular Ecology* 7, 307-316.
- EDWARDS, A. W. F. (1972). *Likelihood*. Expanded (Ed). Johns Hopkins University Press, Baltimore.

- 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.
- EL-KASSABY, Y. A., RUDIN, D. & YAZDANI, R. (1989). Levels of outcrossing and contamination in two *Pinus sylvestris* L. seed orchards in Northern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 4, 41-49.
- EL-KASSABY, Y. A., EDWARDS, D. G. & COOK, C. (1990). Impact of crop management practices on seed yield in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genetica* 39, 226-230.
- EL-KASSABY, Y. A. & DAVIDSON, R. (1991). Impact of Pollination Environment Manipulation on the Apparent Outcrossing Rate in a Douglas-Fir Seed Orchard. *Heredity* 66, 55-59.
- EL-KASSABY, Y. A. (1995). Evaluation of tree-improvement delivery system: factors affecting genetic potential. *Tree Physiology* 15, 545-550.
- EL-KASSABY, Y. A. & JAQUISH, B. (1996). Population density and mating pattern in western larch. *Journal of Heredity* 87, 438-443.
- ELLSTRAND, N. C. (1992). Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63, 77-86.
- ENNOS, R. A., SINCLAIR, W. T., HU, X. S. & LANGDON, A. (1999). Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In *Molecular Systematics and Plant Evolution*. ed. HOLLINGSWORTH PM, B. R., GORNALL RJ, pp. 1-19. Taylor & Francis, London.
- ENNOS, R. A. (1994). Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72, 250-259.
- EPPERSON, B. K. & CHUNG, M. (2001). Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms within populations of *Pinus strobus* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 88, 1006-1010.
- EPPERSON, B. K., CHUNG, M. G. & TELEWSKI, F. W. (2003). Spatial pattern of allozyme variation in a contact zone of *Pinus ponderosa* and *P. arizonica* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 90, 25-31.
- ERICKSON, V. J. & ADAMS, W. T. (1989). Mating success in a coastal Douglas-fir seed orchards as affected by distance and floral phenology. *Canadian Journal of Forest Research* 19, 1248-1255.
- ERIKSSON, E. (2006). Thinning operations and their impact on biomass production in stands of Norway spruce and Scots pine. *Biomass & Bioenergy* 30, 848-854.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.

-- *F* --

- FARRIS, M. A. & MITTON, J. B. (1984). Population-Density, Outcrossing Rate, and Heterozygote Superiority in Ponderosa Pine. *Evolution* 38, 1151-1154.
- FASHLER, A. M. K. & DEVITT, W. J. B. (1980). A practical solution to Douglas-fir seed orchard pollen contamination. *Forestry Chronicle* 56, 237-241.
- FAST, W., DANCIK, B. P. & BOWER, R. C. (1986). Mating System and Pollen Contamination in a Douglas-Fir Clone Bank. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 16, 1314-1319.
- FERNANDEZ-MANJARRES, J. F., IDOL, J. & SORK, V. L. (2006). Mating patterns of black oak *Quercus velutina* (Fagaceae) in a Missouri oak-hickory forest. *Journal of Heredity* 97, 451-455.
- 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.
- FINKELDEY, R. (1995). Homogeneity of pollen allele frequencies of single seed trees in *Picea abies* (L.) Karst. plantations. *Heredity* 74, 451-463.
- FINKELDEY, R. & ZIEHE, M. (2004). Genetic implications of silvicultural regimes. *Forest Ecology and Management* 197, 231-244.
- FRIEDMAN, S. T. & ADAMS, W. T. (1985). Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 69, 609-615.
- FRIES, A. (1994). Development of Flowering and the Effect of Pruning in a Clonal Seed Orchard of Lodgepole Pine. *Canadian Journal of Forest Research* 24, 71-76.
- FUNDA, T., CHEN, C. C., LIEWLAKSANEEYANAWIN, C., KENAWY, A. M. A. & EL-KASSABY, Y. A. (2008). Pedigree and mating system analyses in a western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) experimental population. *Annals of Forest Science* 65, 705p701-705p708.
- FURNIER, G. R. & ADAMS, W. T. (1986). Mating System in Natural-Populations of Jeffrey Pine. *American Journal of Botany* 73, 1002-1008.

-- *G* --

- GARCIA, C., ARROYO, J. M., GODOY, J. A. & JORDANO, P. (2005). Mating patterns, pollen dispersal, and the ecological maternal neighbourhood in a *Prunus mahaleb* L. population. *Molecular Ecology* 14, 1821-1830.
- 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.

- GEBUREK, T. & TUROK, J. (2005). Conservation and management of forest genetic resources in Europe. Arbores Publishers.
- GEBUREK, T. & KONRAD, H. (2008). Why the conservation of forest genetic resources has not worked. *Conservation Biology* 22, 267-274.
- GENG, Q. F., LIAN, C. L., GOTO, S., TAO, J. M., KIMURA, M., ISLAM, M. D. S. & HOGETSU, T. (2008). Mating system, pollen and propagule dispersal, and spatial genetic structure in a high-density population of the mangrove tree *Kandelia candel*. *Molecular Ecology* 17, 4724-4739.
- GERARD, P. R., KLEIN, E. K., AUSTERLITZ, F., FERNANDEZ-MANJARRES, J. F. & FRASCARIA-LACOSTE, N. (2006). Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *BMC Evolutionary Biology* 6.
- GERBER, S., CHABRIER, P. & KREMER, A. (2003). FaMoz: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Molecular Ecology Notes* 3, 479-481.
- GERITZ, S. A. H., DEJONG, T. J. & KLINKHAMER, P. G. L. (1984). The Efficacy of Dispersal in Relation to Safe Site Area and Seed Production. *Oecologia* 62, 219-221.
- GLAUBITZ, J. C., WU, H. X. & MORAN, G. F. (2003). Impacts of silviculture on genetic diversity in the native forest species *Eucalyptus sieberi*. *Conservation Genetics* 3.
- GÖMÖRY, D., BRUCHANIK, R. & PAULE, L. (2000). Effective population number estimation of three Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed orchards based on an integrated assessment of flowering, floral phenology, and seed orchard design. *Forest Genetics* 7, 65-75.
- GONZALEZ-MARTINEZ, S. C., GERBER, S., CERVERA, M. T., MARTINEZ-ZAPATER, J. M., GIL, L. & ALIA, R. (2002). Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1290-1297.
- GONZALEZ-MARTINEZ, S. C., BURCZYK, J., NATHAN, R., NANOS, N., GIL, L. & ALIA, R. (2006). Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *Molecular Ecology* 15, 4577-4588.
- GOSLEE, S. C. & URBAN, D. L. (2007). The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of* 22, 1-19.
- GOSSELIN, M. & VALADON, A. (2005). Synthèse commentée des principaux documents ONF pour la prise en compte de la biodiversité dans la gestion forestière. Convention ONF-Cemagref 2005. Rapport final, 175 p.
- GOTMARK, F., BERGLUND, A. & WIKLANDER, K. (2005). Browsing damage on broadleaved trees in semi-natural temperate forest in Sweden, with a focus on oak regeneration. *Scandinavian Journal of Forest Research* 20, 223-234.

GOTO, S., MIYAHARA, F. & IDE, Y. (2002). Monitoring male reproductive success in a Japanese black pine clonal seed orchard with RAPD markers. Canadian Journal of Forest Research 32, 983-988.

GOTO, S., SHIMATANI, K., YOSHIMARU, H. & TAKAHASHI, Y. (2006). Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites. Molecular Ecology 15, 2985-2996.

GOUBITZ, S., NATHAN, R., ROITEMBERG, R., SHMIDA, A. & NE'EMAN, G. (2004). Canopy seed bank structure in relation to: fire, tree size and density. Plant Ecology 173, 191-201.

GOUDET, J. (1995). fstat version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. Journal of Heredity 86, 485-486.

GREENE, D. F. & JOHNSON, E. A. (1989). Particulate Diffusion-Models and the Dispersal of Seeds by the Wind. Trends Ecol. Evol. 4, 191-192.

GREENE, D. F. & JOHNSON, E. A. (1992). Can the variation in samara mass and terminal velocity on an individual plant affect the distribution of dispersal distances? American Naturalist 139, 825-838.

GREENE, D. F. & JOHNSON, E. A. (1995). Long-Distance Wind Dispersal of Tree Seeds. Canadian Journal of Botany 73, 1036-1045.

GREENE, D. F. & CALOGEROPOULOS, C. (2002). Measuring and modelling seed dispersal in terrestrial plants. In Dispersal Ecology, The 42nd Symposium of the British Ecological Society. ed. J.M. BULLOCK, R.E. KENWARD & HAILS, R. S., pp. 3-23. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK., Reading, UK.

GREGORIUS, H. R., KRAUHAUSEN, J. & MULLER-STARCK, G. (1986). Spatial and temporal genetic differentiation among the seeds in a stand of *Fagus sylvatica* L. Heredity 57, 255-262.

GUITTET, J. & LABERCHE, J. (1974). L'implantation naturelle du pin sylvestre sur pelouse xérophile en forêt de Fontainebleau. II.- Démographie des graines et des plantules au voisinage des vieux arbres. Oecologia Plantarum 9, 111-130.

-- \mathcal{H} --

HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. (1989). Allozyme diversity in plant species. In Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. ed. AHD BROWN, M. C., AL KAHLER, BS WEIR, pp. 43-63. Sinauer, Sunderland, MA.

HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W. & SHERMAN-BROYLES, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6, 95-124.

- HAMRICK, J. L. & NASON, J. D. (1996). Consequences of dispersal in plants. In Population Dynamics in Ecological space and Time. ed. RHODES, O. E., R. K. CHESSER AND M. H. SMITH, pp. 203-236. University of Chicago Press, Chicago.
- HANNERZ, M., ALMQVIST, U. & HORNFELDT, R. (2002). Timing of seed dispersal in *Pinus sylvestris* stands in central Sweden. *Silva Fennica* 36, 757-765.
- HANSEN, O. K. & KJÆR, E. D. (2006). Paternity analysis with microsatellites in a Danish *Abies nordmanniana* clonal seed orchard reveals dysfunctions. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 1054-1058.
- HANSEN, O. K. & NIELSEN, U. B. (2008). Crossing success in *Abies nordmanniana* following artificial pollination with a pollen mixture of *A. nordmanniana* and *A. alba*. *Silvae Genetica* 57, 70-76.
- HARDY, O. J., GONZALEZ-MARTINEZ, S. C., COLAS, B., FREVILLE, H., MIGNOT, A. & OLIVIERI, I. (2004). Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. *Genetics* 168, 1601-1614.
- HARDY, O. J., GONZALEZ-MARTINEZ, S. C., FREVILLE, H., BOQUIEN, G., MIGNOT, A., COLAS, B. & OLIVIERI, I. (2004). Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae) I. Pattern of pollen dispersal. *Journal of Evolutionary Biology* 17, 795-806.
- HARDY, O. J. & VEKEMANS, X. (2002). SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2, 618-620.
- 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.
- HARTL, D. L. & CLARK, A. G., ed. (1989). Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- HEDRICK, P. W. (1999). Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313-318.
- HEDRICK, P. W. (2005). Genetics of populations, vol. 737. Jones and Bartlett, Boston.
- HIGGINS, S. I. & RICHARDSON, D. M. (1999). Predicting plant migration rates in a changing world: the role of long-distance dispersal. *American Naturalist* 153, 464-475.
- HILLI, A., HOKKANEN, T., HYVONEN, J. & SUTINEN, M. L. (2008). Long-term variation in Scots pine seed crop size and quality in northern Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research* 23, 395-403.
- HÓDAR, J. A., CASTRO, J. & ZAMORA, R. (2003). Pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa* as a new threat for relict Mediterranean Scots pine forests under climatic warming. *Biological Conservation* 110, 123-129.

HOLSINGER, K. E. (1991a). Inbreeding Depression and the Evolution of Plant Mating Systems. *Trends in Ecology & Evolution* 6, 307-308.

HOLSINGER, K. E. (1991b). Mass action models of plant mating systems: evolutionary stability of mixed mating systems. *American Naturalist* 138, 606-622.

HORN, H. S., NATHAN, R. & KAPLAN, S. R. (2001). Long-distance dispersal of tree seeds by wind. *Ecological Research* 16, 877-885.

HOSIUS, B., LEINEMANN, L., KONNERT, M. & BERGMANN, F. (2006). Genetic aspects of forestry in the central Europe. *European Journal of Forestry Research* 125, 407-417.

HOUGNER, C., COLDING, J. & SODERQVIST, T. (2006). Economic valuation of a seed dispersal service in the Stockholm National Urban Park, Sweden. *Ecological Economics* 59, 364-374.

HOUSSARD, C. & ESCARRE, J. (1991). The effects of seed weight on growth and competitive ability of *Rumex acetosella* from two successional oldfields. *Oecologia* 86, 236-242.

HOWE, H. F. & SMALLWOOD, J. (1982). Ecology of Seed Dispersal. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 13, 201-228.

HUNTLEY, B. & BIRKS, H. J. B. (1983). An atlas of past and present pollen maps of Europe: 0-13 000 years ago.

HUNTLEY, B. (1990). Dissimilarity mapping between fossil and contemporary pollen spectra in Europe for the past 13,000 years. *Quaternary Research* 33, 360-376.

HYYTIAINEN, K., ILOMAKI, S., MAKELA, A. & KINNUNEN, K. (2006). Economic analysis of stand establishment for Scots pine. *Canadian Journal of Forest Research* 36, 1179-1189.

-- I --

IDF. (2004). <http://www.foretpreefrancaise.com/>.

IFN. (2001-2004). <http://www.ifn.fr/spip/>.

IGN. (2002). Geoportail. <http://www.geoportail.fr/>.

IPCC. (2007). Changements Climatiques 2007:Rapport de synthèse, rapport du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, <http://www.ipcc.ch/>.

IRWIN, A. J., HAMRICK, L. L., GODT, M. J. W. & P.E., S. (2003). A multiyear estimate of the effective pollen donor pool for *Albizia julibrissin*. *Heredity* 90, 187-194.

-- J --

JAMIESON, A. & TAYLOR, C. S. (1997). Comparison of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28, 397-400.

- JARNE, P. & LAGODA, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* 11, 424-429.
- JOHANSSON, T. (2003). Mixed stands in Nordic countries - a challenge for the future. *Biomass and Bioenergy* 24, 365-372.
- JONES, F. A., HAMRICK, J. L., PETERSON, C. J. & SQUIERS, E. R. (2006). Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. *Molecular Ecology* 15, 851-861.
- JONES, F. A. & MULLER-LANDAU, H. C. (2008). Measuring long-distance seed dispersal in complex natural environments: an evaluation and integration of classical and genetic methods. *Journal of Ecology (Oxford)* 96, 642-652.
- JORDANO, P., GARCIA, C., GODOY, J. A. & GARCIA-CASTANO, J. L. (2007). Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 3278-3282.
- JUMP, A. S., HUNT, J. M., MARTINEZ-IZQUIERDO, J. A. & PENUELAS, J. (2006). Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology* 15, 3469-3480.

-- \mathcal{K} --

- KALINOWSKI, S. T., TAPER, M. L. & MARSHALL, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106.
- KANG, K. S. & LINDGREN, D. (1998). Fertility variation and its effect on the relatedness of seeds in *Pinus densiflora*, *Pinus thunbergii* and *Pinus koraiensis* clonal seed orchards. *Silvae Genetica* 47, 196-201.
- KANG, K. (2001). Genetic gain and gene diversity of seed orchard crops. In *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae - Silvestria*, pp. 75.
- KANG, K. S., HARJU, A. M., LINDGREN, D., NIKKANEN, T., ALMQVIST, C. & SUH, G. U. (2001a). Variation in effective number of clones in seed orchards. *New Forests* 21, 17-33.
- KANG, K. S., LINDGREN, D. & MULLIN, T. J. (2001b). Prediction of genetic gain and gene diversity in seed orchard crops under alternative management strategies. *Theoretical and Applied Genetics* 103, 1099-1107.
- KANG, K. S., EL-KASSABY, Y. A., CHOI, W. Y., HAN, S. U. & KIM, C. S. (2003). Genetic gain and diversity caused by genetic thinning in a clonal seed orchard of *Pinus densiflora*. *Silvae Genetica* 52, 220-223.
- KARKKAINEN, K. & SAVOLAINEN, O. (1993). The Degree of Early Inbreeding Depression Determines the Selfing Rate at the Seed Stage - Model and Results from *Pinus-Sylvestris* (Scots Pine). *Heredity* 71, 160-166.

- KARLSSON, C. (2000). Seed production of *Pinus sylvestris* after release cutting. Canadian Journal of Forest Research 30, 982-989.
- KARLSSON, C. & ORLANDER, G. (2000). Soil scarification shortly before a rich seed fall improves seedling establishment in seed tree stands of *Pinus sylvestris*. Scandinavian Journal of Forest Research 15, 256-266.
- KATUL, G. G., PORPORATO, A., NATHAN, R., SIQUEIRA, M., SOONS, M. B., POGGI, D., HORN, H. S. & LEVIN, S. A. (2005). Mechanistic analytical models for long-distance seed dispersal by wind. American Naturalist 166, 368-381.
- KAYA, N., ISIK, K. & ADAMS, W. T. (2006). Mating system and pollen contamination in a *Pinus brutia* seed orchard. New Forests 31, 409-416.
- KELLY, D. & SORK, V. L. (2002). Mast seeding in perennial plants: why, how, where? Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 33, 427-447.
- KERR, G., GOSLING, P., MORGAN, G., STOKES, V., CUNNINGHAM, V. & PARRATT, M. (2008). Seed production and seedling survival in a 50-year-old stand of Corsican pine (*Pinus nigra* subsp *laricio*) in southern Britain. Forestry 81, 525-541.
- KJAER, E. D. (1996). Estimation of effective population number in a *Picea abies* (Karst) seed orchard based on flower assessment. Scandinavian Journal of Forest Research 11, 111-121.
- KJAER, E. D. & WELLENDORF, H. (1998). Studies on the effect of unequal flowering on the effective population number in Danish seed orchard crops. Forest Tree Improvement 26, 1-9.
- KNAPP, E. E., GOEDDE, M. A. & RICE, K. J. (2001). Pollen-limited reproduction in blue oak: implications for wind pollination in fragmented populations. Oecologia 128, 48-55.
- KNOWLES, P., FURNIER, G. R., ALEKSIUK, M. K. & PERRY, D. J. (1987). Significant levels of self-fertilization in natural populations of tamarack. Canadian Journal of Botany 65, 1087-1091.
- KNOWLES, P., PERRY, P. J. & FOSTER, H. A. (1992). Spatial genetic structure in two tamarack [*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch] populations with differing establishment histories. Evolution 46, 572-576.
- KONNERT, M. & BEHM, A. (1999). Genetic structure of a seed collection: influencing factors and possibilities. Beitrage fur Forstwirtschaft und Landschaftsökologie 33, 152-156.
- KOSKELA, J., BUCK, A. & TEISSIER DU CROS, E. (2007). Climate change and forest genetic diversity: implications for sustainable forest management in Europe. In Bioversity International. ed. J. KOSKELA, A. B., ET E. TEISSIER DU CROS, Rome.
- KOSKI, V. & TALLQVIST, R. (1978). Results of Long-Time Measurements of the Quantity of the Flowering and Seed Crop of Forest Trees. Folia For 364, 1-60.

KRAMER, A. T., ISON, J. L., ASHLEY, M. V. & HOWE, H. F. (2008). The paradox of forest fragmentation genetics. *Conservation Biology* 22, 878-885.

KROUCHI, F., DERRIDJ, A. & LEFEVRE, F. (2004). Year and tree effect on reproductive organisation of *Cedrus atlantica* in a natural forest. *Forest Ecology and Management* 197, 181-189.

KUMAR, S., GERBER, S. & RICHARDSON, T. E. (2007). Testing for non-random contribution of pollen parents using microsatellites and chloroplast markers in polycross families of *Pinus radiata* D. Don. *Tree Genetics & Genomes* 3, 207-214.

-- *L* --

LANGE, W. & WEIBMANN, G. (1988). Die Zusammensetzung der Harzbalsame von *Pinus sylvestris* L. verschiedener Herkünfte. *Hols als Roh- und Werkstoff* 46, 157-161.

LANNER, R. M. (1998). Seed dispersal in *Pinus*. In *Ecology and biogeography of Pinus*. ed. RICHARDSON, D. M., pp. 281–295. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

LE CORRE, V., DUMOLINLAPEGUE, S. & KREMER, A. (1997a). Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt) Liebl: The role of history and geography. *Molecular Ecology* 6, 519-529.

LE CORRE, V., MACHON, N., PETIT, R. J. & KREMER, A. (1997b). Colonization with long-distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees: a simulation study. *Genetical Research* 69, 117-125.

LEDIG, F. T. & CONKLE, M. T. (1983). Gene Diversity and Genetic-Structure in a Narrow Endemic, Torrey Pine (*Pinus-Torreyana* Parry Ex Carr). *Evolution* 37, 79-85.

LEDIG, F. T. (1986). Conservation Strategies for Forest Gene Resources. *Forest Ecology and Management* 14, 77-90.

LEDIG, F. T. (1992). Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63, 87-108.

LEDIG, F. T. (1998). Genetic variation in *Pinus*. In *Ecology and biogeography of Pinus*. ed. RICHARDSON, D. M., pp. 215-280. Cambridge University Press, Cambridge.

LEE, C. S., KIM, J. H., YI, H. & YOU, Y. H. (2004). Seedling establishment and regeneration of Korean red pine (*Pinus densiflora* S. et Z.) forests in Korea in relation to soil moisture. *Forest Ecology and Management* 199, 423-432.

LEFEBVRE, C. (1885). Le pin sylvestre dans les forêts d'Orléans et de Montargis. *Revue des Eaux et Forêts*, 241-254.

LEFEVRE, F. (2004). Human impacts on forest genetic resources in the temperate zone: an updated review. *Forest Ecology and Management* 197, 257-271.

LEGENDRE, P. & LEGENDRE, L. (1989). *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam.

- LENORMAND, T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 183-189.
- LIAN, C. L., MIWA, M. & HOGETSU, T. (2001). Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87, 88-98.
- LIAN, S., GOTO, S., KUBO, T., TAKAHASHI, Y., NAKAGAWA, M. & HOGETSU, T. (2008). Nuclear and chloroplast microsatellite analysis of *Abies sachalinensis* regeneration on fallen logs in a subboreal forest in Hokkaido, Japan. *Molecular Ecology* 17, 2948 - 2962.
- LIEPELT, S., KUHLENKAMP, V., ANZIDEI, M., VENDRAMIN, G. G. & ZIEGENHAGEN, B. (2001). Pitfalls in determining size homoplasy of microsatellite loci. *Molecular Ecology Notes* 1, 332-335.
- LIN, J., PAUL, A. & FULTON, M. R. (2001). Characterizing shade tolerance by the relationship between mortality and growth in tree saplings in a south-eastern Texas forest. *Canadian Journal of Forestry Research* 31, 345-349.
- LINDGREN, D. (1994). Effect of tree cover on Scots pine pollination and seeds. *Forest Genetics* 1, 73-80.
- LINDGREN, D. & MULLIN, T. J. (1998). Relatedness and status number in seed orchard crops. *Canadian Journal of Forest Research* 28, 276-283.
- LINDNER, M., GARCIA-GONZALO, J., KOLSTRÖM, M., GREEN, T., REGUERA, R., MAROSCHEK, M., SEILD, R., LEXER, M., NETHERER, S., SCHOPF, A., KREMER, A., DELZON, S., BARBATI, A., MARCHETTI, M. & CORONA, P. (2008). Impact of climate change on European forests and options for adaptation, pp. 223. European Commission Directorate-General for Agriculture and rural Development, Report AGRI-2007-G4-06.
- LINHART, Y. B., MITTON, J. B., BOWMAN, D. M., STURGEON, K. B., AND & HAMRICK, J. L. (1979). Genetic aspects of fertility differentials in ponderosa pine. *Genetic Research* 33, 237-249.
- LINHART, Y. B. & GRANT, M. C. (1996). Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 237-277.
- LOISELLE, B. A., SORK, V. L., NASON, J. & GRAHAM, C. (1995). Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82, 1420-1425.
- LOURMAS, M., KJELLBERG, F., DESSARD, H., JOLY, H. & CHEVALLIER, M. H. (2007). Reduced density due to logging and its consequences on mating system and pollen flow in the African mahogany *Entandrophragma cylindricum*. *Heredity* 99, 151-160.
- LOVELESS, M. D. & HAMRICK, J. L. (1984). Ecological Determinants of Genetic-Structure in Plant-Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15, 65-95.

LYGIS, V., VASILIAUSKAS, R., STENLID, J. & VASILIAUSKAS, A. (2004). Silvicultural and pathological evaluation of Scots pine afforestations mixed with deciduous trees to reduce the infections by *Heterobasidion annosum* s.s. Forest Ecology and Management 201, 275-285.

-- *M* --

MACFARLANE, D. W., GREEN, E. J., BRUNNER, A. & BURKHART, H. E. (2002). Predicting survival and growth rates for individual loblolly pine trees from light capture estimate. Canadian Journal of Forest research 32, 1970-1983

MANEL, S., SCHWARTZ, M. K., LUIKART, G. & TABERLET, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population. TRENDS in Ecology and Evolution 18, 189-197.

MANTEL, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27, 209-220.

MARJOUX, A. (2005). Rôle de la densité d'arbres reproducteurs sur la qualité génétique des graines. Mémoire de Master II EТАH, Université d'Orléans. INRA Orléans-CGAF, 33p + Annexes.

MARQUARDT, P. E. & EPPERSON, B. K. (2004). Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. Molecular Ecology 13, 3305-3315.

MARQUARDT, P. E., ECHT, C. S., EPPERSON, B. K. & PUBANZ, D. M. (2007). Genetic structure, diversity, and inbreeding of eastern white pine under different management conditions. Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere 37, 2652-2662.

MARSHALL, T. C., SLATE, J., KRUUK, L. E. B. & PEMBERTON, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology 7, 639-655.

MATZIRIS, D. I. (1994). Genetic variation in the phenology of flowering in black pine. Silvae Genetica 43, 321-328.

MCCAULEY, D. E. (1995). The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. TRENDS in Ecology and Evolution 10, 198-202.

MCNEIL, W. M. (1954). Observation on cone and seed production in plantations of Scots pine in Scotland. Forestry 27, 122-133.

MEAGHER, T. R. (1986). Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. American Naturalist 128, 199-215.

MEFFE, G. & CARROLL, C. (1997). Principles of Conservation Biology. Sinauer Associates, New York.

- MILLAR, C. I., STEPHENSON, N. L. & STEPHENS, S. L. (2007). Climate change and forests of the future: Managing in the face of uncertainty. *Ecological Applications* 17, 2145–2151.
- MILLAR, M. A., BYRNE, M., NUBERG, I. & SEDGLEY, M. (2008). High outcrossing and random pollen dispersal in a planted stand of *Acacia saligna* subsp *saligna* revealed by paternity analysis using microsatellites. *Tree Genetics & Genomes* 4, 367-377.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE. (2006). Stratégie nationale pour la biodiversité. Plan d'action forêt.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE. (2007). Conseils d'utilisation des provenances et variétés forestières. Le Douglas vert <http://agriculture.gouv.fr/sections/thematiques/foret-bois/graines-et-plants-forestiers>.
- MITTON, J. B. (1992). The dynamic mating systems of conifers. *New Forests* 6.
- MORGANTE, M., VENDRAMIN, G. G. & ROSSI, P. (1991). Effects of Stand Density on Outcrossing Rate in 2 Norway Spruce (*Picea-Abies*) Populations. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 69, 2704-2708.
- MORGANTE, M., VENDRAMIN, G. G., ROSSI, P. & OLIVIERI, A. M. (1993). Selection against inbreds in early life-cycle phases in *Pinus leucodermis* ant. *Heredity* 70, 622-627.
- MORGANTE, M., FELICE, N. & VENDRAMIN, G. G. (1997). Analysis of hypervariable chloroplast microsatellites in *Pinus halepensis* reveals a dramatic genetic bottleneck. In *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. ed. A. KARP, P. O. I. A. D. S. I., pp. 407-412. Chapman and Hall, London.
- 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.
- MORIGUCHI, Y., TSUCHIYA, S., IWATA, H., ITOO, S., TANI, N., TAIRA, H. & TSUMURA, Y. (2007). Factors influencing male reproductive success in a *Cryptomeria japonica* seed orchard revealed by microsatellite marker analysis. *Silvae Genetica* 56, 207-214.
- MORTIER, F. (2001). Reconstitution des forêts après tempêtes: guide. Paris : ONF. Direction technique, 148p.
- MOSSELER, A., INNES, D. J. & ROBERTS, B. A. (1991). Lack of Allozymic Variation in Disjunct Newfoundland Populations of Red Pine (*Pinus-Resinosa*). *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 21, 525-528.
- MULLER-STARCK, G. (1982). Reproductive systems in conifer seed orchards. I. Mating probabilities in a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. *Silvae Genetica* 31, 188-197.
- MULLER-STARCK, G. (1995). Protection of genetic variability in forest trees. *Forest Genetics* 2, 121-124.

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.

MUONA, O., MORAN, G. F. & BELL, J. C. (1991). Hierarchical Patterns of Correlated Mating in *Acacia-Melanoxyton*. *Genetics* 127, 619-626.

-- \mathcal{N} --

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.

NAKANISHI, A., TOMARU, N., YOSHIMARU, H., KAWAHARA, T., MANABE, T. & YAMAMOTO, S. (2004). Patterns of pollen flow and genetic differentiation among pollen pools in *Quercus salicina* in a warm temperate old-growth evergreen broad-leaved forest. *Silvae Genetica* 53, 258-264.

NAKANISHI, A., TOMARU, N., YOSHIMARU, H., MANABE, T. & YAMAMOTO, S. (2005). Interannual genetic heterogeneity of pollen pools accepted by *Quercus salicina* individuals. *Molecular Ecology* 14, 4469-4478.

NAKASHIZUKA, T. (2001). Species coexistence in temperate, mixed deciduous forests. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 205-210.

NAMKOONG, G., BOYLE, T., EL-KASSABY, Y. A., PALMBERG-LERCHE, G. C., ERIKSSON, G., GREGORIUS, H. R., JOLY, H., KREMER, A., SAVLAINEN, O., WICKNESWARI, R., YOUNG, A., ZEH-NLO, M. & PRABHU, R. (2002). Criteria and Indicators for Assessing the Sustainability of Forest Management: Conservation of Biological Diversity and Genetic Variation. In Working Paper FGR/37E, pp. 1-29. FAO, Rome.

NANOS, N., GONZALEZ-MARTINEZ, S. C. & BRAVO, F. (2004). Studying within-stand structure and dynamics with geostatistical and molecular marker tools. *Forest Ecology and Management* 189, 223-240.

NANSON, A., JACQUES, D. & SERVAIS, A. I. (1991). La régénération naturelle du point de vue génétique. *Forêt Wallone* 12, 19-21.

NATHAN, R., SAFRIEL, U. N., NOY-MEIR, I. & SCHILLER, G. (1996) Samara's aerodynamic properties in *Pinus halepensis* Mill., a colonizing tree species, remain constant despite considerable variation in morphology. In: I. Steinberger, Editor, *Preservation of Our World in the Wake of Change*, pp. 553-556.

NATHAN, R., SAFRIEL, U. N., NOY-MEIR, I. & SCHILLER, G. (1999). Seed release without fire in *Pinus halepensis*, a Mediterranean serotinous wind-dispersed tree. *Journal of Ecology* 87, 659-669.

NATHAN, R. & MULLER-LANDAU, H. C. (2000). Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology & Evolution* 15, 278-285.

- NATHAN, R., SAFRIEL, U. N., NOY-MEIR, I. & SCHILLER, G. (2000). Spatiotemporal variation in seed dispersal and recruitment near and far from *Pinus halepensis* trees. *Ecology* 81, 2156-2169.
- NATHAN, R., SAFRIEL, U. N. & NOY-MEIR, I. (2001). Field validation and sensitivity analysis of a mechanistic model for tree seed dispersal by wind. *Ecology* 82, 374-388.
- NATHAN, R. (2006). Long-distance dispersal of plants. *Science* 313, 786-788.
- NATHAN, R., SCHURR, F. M., SPIEGEL, O., STEINITZ, O., TRAKHTENBROT, A. & TSOAR, A. (2008). Mechanisms of long-distance seed dispersal. *TRENDS in Ecology and Evolution* 23, 638-647.
- NAYDENOV, K.D., TREMBLAY, M.F., ALEXANDROV, A. & FENTON, N.J. (2005) Structure of *Pinus sylvestris* L. populations in Bulgaria revealed by chloroplast microsatellites and terpenes analysis: Provenance tests. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 1226-1245
- NEALE, D. B. & ADAMS, W. T. (1985). The Mating System in Natural and Shelterwood Stands of Douglas-Fir. *Theoretical and Applied Genetics* 71, 201-207.
- NGO BIENG, M. A., GINISTY, C., GOREAUD, F. & PEROT, T. (2006). A first typology of Oak and Scots pine mixed stands in the Orleans forest (France), based on the canopy spatial structure. *New Zealand Journal of Forestry Science* 36, 325-346.
- NGO BIENG, M. A. (2007). Construction de modèles de structure spatiale permettant de simuler des peuplements virtuels réalistes. application aux peuplements mélangés chêne sessile - pin sylvestre de la région centre. In ENGREF, pp. 213.
- NIKKANEN, T. & RUOTSALAINEN, S. (2000). Variation in flowering abundance and its impact on the genetic diversity of the seed crop in a Norway spruce seed orchard. *Silva Fennica* 34, 205-222.
- NIKKANEN, T., PAKKANEN, A. & HEINONEN, J. (2002). Temporal and spatial variation in airborne pollen and quality of the seed crop in a Norway spruce seed orchard. *Forest Genetics* 9, 243-255.
- NOSS, R. (2001.). Beyond Kyoto: forest management in a time of rapid climate change. *Conservation Biology* 15, 578-590.
- NUNNEY, L. & CAMPBELL, K. A. (1993). Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 8, 234-239.
- NYBOM, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13, 1143-1155.

-- O --

- O'CONNELL, L. M., MOSSELER, A. & RAJORA, O. P. (2006). Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97, 418-426.

- ODDOU-MURATORIO, S., PETIT, R. J., LE GUERROUE, B., GUESNET, D. & DEMESURE, B. (2001). Pollen- versus seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species. *Evolution* 55, 1123-1135.
- ODDOU-MURATORIO, S., KLEIN, E. K. & 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.
- ODDOU-MURATORIO, S., KLEIN, E. K., DEMESURE-MUSCH, B. & AUSTERLITZ, F. (2006). Real-time patterns of pollen flow in the wild-service tree, *Sorbus torminalis* (Rosaceae). III. Mating patterns and the ecological maternal neighborhood. *American Journal of Botany* 93, 1650-1659.
- ODEN, N. L. & SOKAL, R. R. (1986). Directional autocorrelation: an extension of spatial correlograms to two dimensions. *SYSTEMATIC ZOOLOGY* 35, 608-617.
- OKSANEN, J., KINTDT, R., LEGENDRE, P., O'HARA, B., SIMPSON, G. L., SOLYMOS, P., STEVENS, M. H. H. & WAGNER, H. (2008). vegan: Community Ecology Package.
- O'NEILL, G. A., HAMANN, A. & WANG, T. (2008). Accounting for population variation improves estimates of climate change impacts on species' growth and distribution. *Journal of Applied Ecology* 45, 1040-1049.
- O'REILLY, C., PARKER, W. H. & BARKER, J. E. (1982). Effect of pollination period and strobili number on random mating in a clonal seed orchard of *Picea mariana*. *Silvae Genetica* 31, 90-94.
- OSHAWA, T., TSUDA, Y., SAITO, Y., SAWADA, H. & IDE, Y. (2007). Steep slopes promote downhill dispersal of *Quercus crispula* seeds and weaken the fine-scale genetic structure of seedlings populations. *Annales des Sciences Forestières* 60, 405-412.
- OTTO, H. J. (1997). Les forêts de Basse-Saxe en Allemagne du nord: un passé difficile commande une gestion nouvelle. Deuxième partie: le programme gouvernemental « LÖWE », principes d'une sylviculture proche de la nature. *Revue Forestière Française* 49, 477-488.
- *P* --
- PACALA, S. W., CANHAM, C. D., SILANDER, J. A. & KOBE, R. K. (1994). Sapling growth as a function of resources in a north temperate forest. *Canadian Journal of Forest Research* 24, 2172-2183
- PAF. Plan d'action forêt, Septembre 2006 .Stratégie nationale pour la biodiversité. Ministère de l'agriculture et de la pêche.
- PAKKAD, G., UENO, S. & YOSHIMARU, H. (2008). Gene flow pattern and mating system in a small population of *Quercus semiserrata* Roxb. (Fagaceae). *Forest Ecology and Management* 255, 3819-3826.

- PAKKANEN, A., PULKKINEN, P. & VAKKARI, P. (1991). Pollen contamination in the years 1988-1989 in some old Scots pine seed orchards of northern Finnish origin. In *Metsanjalostussaation Tiedonantoja*, vol. 3, pp. 8.
- 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.
- PALOWSKI, B. (2000). Seed yield from polluted stands of *Pinus sylvestris* L. *New Forests* 20, 15-22.
- PALUCH, J. G. & L.E., B. (2004). Spatial interactions between Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), common oak (*Quercus robur* L.) and silver birch (*Betula pendula* Roth.) as investigated in stratified stands in mesotrophic site conditions. *Forest Ecology and Management* 119, 229-240.
- PARDOS, M., MONTES, F. & CANELLAS, I. (2008). Spatial dynamics of natural regeneration in two differently managed *Pinus sylvestris* stands before and after silvicultural intervention using replicated spatial point patterns. *Forest Science* 54, 260-272.
- PAULE, L., LINDGREN, D. & YAZDANI, R. (1993). Allozyme Frequencies, Outcrossing Rate and Pollen Contamination in *Picea abies* Seed Orchards. *Scandinavian Journal of Forest Research* 8, 8-17.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- PERRY, D. J. & BOUSQUET, J. (2001). Genetic diversity and mating system of post-fire and post-harvest black spruce: an investigation using codominant sequence-tagged-site (STS) markers. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 31, 32-40.
- PETIT, R. J., HAMPE, A. & CHEDDADI, R. (2005). Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *Taxon* 54, 877-885.
- PETIT, R. J. & HAMPE, A. (2006). Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology and Systematics* 37, 187-214.
- PICHOT, C., BASTIEN, C., COURBET, F., DEMESURE-MUSCH, B., DREYFUS, P., FADY, B., FRASCARIA-LACOSTE, N., GERBER, S., LEFÈVRE, F., MORAND-PRIEUR, M. E., ODDOU, S., TESSIER DU CROS, E. & VALADON, A. (2006). Déterminants et conséquences de la qualité génétique des graines et semis lors de la phase initiale de régénération naturelle des peuplements forestiers. Papier présenté au 6ème. Colloque National du BRG, La Rochelle (FRA).
- 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.

- POWELL, W., MORGANTE, M., MCDEVITT, R., VENDRAMIN, G. G. & RAFALSKI, J. A. (1995). Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 7759-7763.
- PRESCHER, F., LINDGREN, D., ALMQVIST, C., KROON, J., LESTANDER, T. A. & MULLIN, T. J. (2007). Female fertility variation in mature *Pinus sylvestris* clonal seed orchards. *Scandinavian Journal of Forest Research* 22, 280-289.
- PROVAN, J., SORANZO, N., WILSON, N. J., MCNICOL, J. W., FORREST, G. I., COTTRELL, J. & POWELL, W. (1998). Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings - Royal Society of London* 265, 1697-1705.
- PROVAN, J., POWELL, W. & HOLLINGSWORTH, P. M. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 142-147.
- PRUS-GLOWACKI, W., URBANIAK, L. & ZUBROWSKA-GIL, M. (1993). Allozyme differentiation in some European populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Genetica Polonica* 34, 156-176.
- PULKKINEN, P., VARIS, S., PAKKANEN, A., KOIVURANTA, L., VAKKARI, P. & PARANTAINEN, A. (2009). Southern pollen sired more seeds than northern pollen in southern seed orchards established with northern clones of *Pinus sylvestris*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 24, 8-14.
- \mathcal{R} --
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- RAJORA, O. P. (1999). Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. *Theoretical and Applied Genetic* 99, 954-961.
- RAJORA, O. P., MOSSELER, A. & MAJOR, J. E. (2002). Mating system and reproductive fitness traits of eastern white pine (*Pinus strobus*) in large, central versus small, isolated, marginal populations. *Canadian Journal of Botany* 80, 1173-1184.
- REHFELDT, G. E., TCHEBAKOVA, N. M., PARFENOVA, Y. I., WYKOFF, W. R., N.A., K. & Milyutin, L. I. (2002). Intraspecific responses to climate in *Pinus sylvestris*. *Global Change Biology* 8, 912-929.
- RESTOUX, G. (2009). Variabilité spatio-temporelle de la reproduction chez une espèce pérenne monoïque : le cas du sapin pectiné, *Abies alba* Miller, en limite sud de son aire de répartition. Thèse Université Aix Marseille III. 246p.
- RIBBENS, E., SILANDER, J. A. & PACALA, S. W. (1994). Seedling Recruitment in Forests - Calibrating Models to Predict Patterns of Tree Seedling Dispersion. *Ecology* 75, 1794-1806.

- RIBEIRO, M. M., LE PROVOST, G., GERBER, S., VENDRAMIN, G. G., ANZIDEI, M., DECROOCQ, S., MARPEAU, A., MARIETTE, S. & PLOMION, C. (2002). Origin identification of maritime pine stands in France using chloroplast simple-sequence repeats. *Annales des Sciences Forestières* 59, 53-62.
- RITLAND, K. & JAIN, S. K. (1981). A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47, 35-52.
- RITLAND, K. (1989). Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43, 848-859.
- RITLAND, K. (2002). Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. *Heredity* 88, 221-228.
- ROBERDS, J. H., FRIEDMAN, S. T. & ELKASSABY, Y. A. (1991). Effective Number of Pollen Parents in Clonal Seed Orchards. *Theoretical and Applied Genetics* 82, 313-320.
- ROBLEDO-AMUNCIO, J. J., SMOUSE, P. E., GIL, L. & ALIA, R. (2004a). Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *Forest Ecology and Management* 197, 245-255.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J., ALIA, R. & GIL, L. (2004b). Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology* 13, 2567-2577.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J. & GIL, L. (2005). Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94, 13-22.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J., COLLADA, C., ALIA, R. & GIL, L. (2005). Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography* 32, 595-605.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J. & AUSTERLITZ, F. (2006). Pollen dispersal in spatially aggregated populations. *The American Naturalist* 168, 500-511.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J., AUSTERLITZ, F. & SMOUSE, P. E. (2006). A new method of estimating the pollen dispersal curve independently of effective density. *Genetics* 173, 1033-1045.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J., AUSTERLITZ, F. & SMOUSE, P. E. (2007). POLDISP: A software package for indirect estimation of contemporary pollen dispersal. *Molecular Ecology Notes* 7, 763-766.
- ROMAN-AMAT, B. (2007). Préparer les forêts françaises au changement climatique. In http://agriculture.gouv.fr/sections/publications/rapports/preparerforets/downloadFile/FichierAttache_1_f0/rapport-changt_climatbra.pdf.
- ROSENSTEIN, J. M. (1993). La Llagonne, La Cabanasse. Histoire de deux sécheries de graines forestières dans les Pyrénées Orientales., pp. 80 + Annexes. Office National des Forêts.

ROTACH, P. (1994). Genetic diversity and practical forestry activity: problems and the need to act. *Schweizerische Zeitschrift fur Forstwesen* 145, 999-1020.

ROUSSEL, L. (1953). La lumière et la forêt. *Revue Forestière Française* 4, 273-290.

ROUSSET, F. (1996). Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* 142, 1357-1362.

ROUSSET, F. (2004). *Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations*, Princeton, NJ.

RUUSKA, J., SIIPILEHTO, J. & VALKONEN, S. (2008). Effect of edge stands on the development of young *Pinus sylvestris* stands in southern Finland. *Scandinavian Journal of Forest Research* 23, 214-226.

-- S --

SAGNARD, F., PICHOT, C., DREYFUS, P., JORDANO, P. & FADY, B. (2007). Modelling seed dispersal to predict seedling recruitment: recolonization dynamics in a plantation forest. *Ecological Modelling* 203, 464-474.

SAMPSON, J. F. (1998). Multiple paternity in *Eucalyptus rameliana* (Myrtaceae). *Heredity* 81, 349-355.

SARVAS, R. (1962). Investigations on the Flowering and Seed Crop of *Pinus sylvestris*. *Communicationes Instituti Forestale Fennica* 53, 1-198.

SAVOLAINEN, O. & KARKKAINEN, K. (1992). Effect of forest management on gene pools. *New Forests* 6, 329-345.

SAVOLAINEN, O., KARKKAINEN, K., HARJU, A., NIKKANEN, T. & RUSANEN, M. (1993). Fertility Variation in *Pinus sylvestris* - a Test of Sexual Allocation Theory. *American Journal of Botany* 80, 1016-1020.

SAVOLAINEN, O., PYHÄJÄRVI, T. & KNÜRR, T. (2007). Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 38, 595-619.

SCHNABEL, A., NASON, J. D. & HAMRICK, J. L. (1998). Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: seed dispersal and variation in female reproductive success. *Molecular Ecology* 7, 819-832.

SCHOEN, D. J. & CLEGG, M. T. (1984). Estimation of Mating System Parameters When Outcrossing Events Are Correlated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81, 5258-5262.

SCHOEN, D. J. (1985). Correlation between classes of mating events in two experimental plant populations. *Heredity* 55, 381-385.

SCHOEN, D. J., DENTI, D. & STEWARD, S. C. (1986). Strobilus production in a clonal white spruce seed orchard: evidence for unbalanced mating. *Silvae Genetica* 35, 201-205.

- SCHOEN, D. J. & STEWART, S. C. (1987). Variation in Male Fertilities and Pairwise Mating Probabilities in *Picea glauca*. *Genetics* 116, 141-152.
- SCHUPP, E. W. & FUENTES, M. (1995). Spatial patterns of seed dispersal and the unification of plant population ecology. *Ecoscience* 2, 267-275.
- SCHURR, F. M., BOND, W. J., MIDGLEY, G. F. & HIGGINS, S. I. (2005). A mechanistic model for secondary seed dispersal by wind and its experimental validation. *Journal of Ecology (Oxford)* 93, 1017-1028.
- SCHURR, F. M., STEINITZ, O. & NATHAN, R. (2008). Plant fecundity and seed dispersal in spatially heterogeneous environments: models, mechanisms and estimation. *Journal of Ecology* 96, 628-641.
- SCHUSTER, W. S. F. & MITTON, J. B. (2000). Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Heredity* 84, 348-361.
- SCOTTI, I., GUGERLI, F., PASTORELLI, R., SEBASTIANI, F. & VENDRAMIN, G. G. (2008). Maternally and paternally inherited molecular markers elucidate population patterns and inferred dispersal processes on a small scale within a subalpine stand of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Forest Ecology and Management* 255, 3806-3812.
- SHEN, H. H., RUDIN, D. & LINDGREN, D. (1981). Study of the pollination pattern in a Scots pine seed orchard by means of isozyme analysis. *Silvae Genetica* 30, 7-15.
- SHEN, X. H., ZHANG, D. M., LI, Y. & ZHANG, H. X. (2007). Temporal and Spatial Change of the Mating System in a Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr. In Seed Orchard Conference, Sept 26-28, Umea.
- SIMARD, M. & PAYETTE, S. (2005). Reduction of black spruce seed bank by spruce budworm infestation compromises postfire stand regeneration. *Canadian Journal of Forest Research* 35, 1686-1696.
- SKELLAM, J. G. (1951). Random dispersal in theoretical populations. *Biometrika* 38, 196-218.
- SLAVOV, G. T., HOWE, G. T. & ADAMS, W. T. (2005a). Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. *Canadian Journal of Forest Research* 35, 1592-1603.
- SLAVOV, G. T., HOWE, G. T., GYAOUROVA, A. V., BIRKES, D. S. & ADAMS, W. T. (2005b). Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. *Molecular Ecology* 14, 3109-3121.
- SMITH, D. B. & ADAMS, W. T. (1983). Measuring pollen contamination in clonal seed orchards with the aid of genetic markers. In 17th South. For. Tree Improv. Conf., pp. 69-77, Athens, GA.
- SMOUSE, P. E., LONG, J. C. & SOKAL, R. R. (1986). Multiple-Regression and Correlation Extensions of the Mantel Test of Matrix Correspondence. *SYSTEMATIC ZOOLOGY* 35, 627-632.

- SMOUSE, P. E., DYER, R. J., WESTFALL, R. D. & SORK, V. L. (2001). Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* 55, 260-271.
- SMOUSE, P. E. & SORK, V. L. (2004). Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecology and Management* 197, 21-38.
- SOKAL, R. R. (1979). Ecological parameters inferred from spatial correlograms. In *Contemporary quantitative ecology and related econometrics*. ed. ROSENZWEIG, G. P. P. E. M., pp. 167-196. International Co-operative Publishing House, Fairland, Maryland.
- SORANZO, N., PROVAN, J., POWELL, W. (1998) Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7, 1260-1261
- SORENSEN, F. (1972). The Seed Orchard Tree as a Pollen Sampler: A model and Example, pp. 1-11. Pacific Northwest Forest Experiment Station.
- SORK, V. L., DAVIS, F. W., SMOUSE, P. E., APSIT, V. J., DYER, R. J., FERNANDEZ-M, J. F. & KUHN, B. (2002). Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? *Molecular Ecology* 11, 1657-1668.
- SORK, V. L., SMOUSE, P. E., APSIT, V. J., DYER, R. J. & WESTFALL, R. D. (2005). A two-generation analysis of pollen pool genetic structure in flowering dogwood, *Cornus florida* (Cornaceae), in the Missouri Ozarks. *American Journal of Botany* 92, 262-271.
- SOUSA, V. A., SEBBENN, A. M., HATTEMER, H. H. & ZIEHE, M. (2005). Correlated mating in populations of a dioecious Brazilian conifer, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Forest Genetics* 12, 107-119.
- SPITTLEHOUSE, D. L. & STEWART, R. B. (2003). Adaptation to climate change in forest management. *BC Journal of Ecosystems and Management* 4, 1-11.
- SQUILLACE, A. E. & LONG, E. M. (1981). Proportion of pollen from non-orchard sources. In *Pollen Management Handbook*, vol. 587. ed. FRANKLIN, E. C., pp. 15-19. U.S.D.A. Agriculture Handbook, Washington D.C.
- STEWART, S. C. (1994). Simultaneous estimation of pollen contamination and pollen fertilities of individual trees in conifer seed orchards using multilocus genetic data. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 593-596.
- STOEHR, M. U., ORVAR, B. L., VO, T. M., GAWLEY, J. R., WEBBER, J. E. & NEWTON, C. H. (1998). Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research* 28, 187-195.
- STOEHR, M. U. (2000). Seed production of western larch in seed-tree systems in the southern interior of British Columbia. *Forest Ecology and Management* 130, 7-15.
- STOEHR, M. U. & NEWTON, C. H. (2002). Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. *Canadian Journal of Forest Research* 32, 469-476.

- 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.
- STOEHR, M., O'NEILL, G., HOLLEFREUND, C. & YANCHUK, A. (2005). Within and among family variation of orchard and wild-stand progeny of interior spruce in British Columbia. *Tree Genetics and Genomes* 1, 64-68.
- STORFER, A., MURPHY, M. A., EVANS, J. S., GOLDBERG, C. S., ROBINSON, S., SPEAR, S. F., DEZZANI, R., DEMELLE, E., VIERLING, L. & WAITS, L. P. (2007). Putting the “landscape” in landscape genetics. *Heredity* 80, 128-142.
- STOYAN, D. & WAGNER, S. (2001). Estimating the fruit dispersion of anemochorous forest trees. *Ecological Modelling* 145, 35-47.
- STREIFF, R., DUCOUSSO, A. & KREMER, A. (1998a). Spatial genetic structure and pollen gene flow in a mixed oak stand. *Genetics, Selection, Evolution* 30, S137-S152.
- STREIFF, R., LABBE, T., BACILIERI, R., STEINKELLNER, H., GLOSSL, J. & KREMER, A. (1998b). Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology* 7, 317-328.
- STREIFF, R., DUCOUSSO, A., LEXER, C., STEINKELLNER, H., GLOESSL, J. & KREMER, A. (1999). Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* 8, 831-841.
- SZMIDT, A. E., WANG, X. R. & CHANGTRAGOON, S. (1996). Contrasting patterns of genetic diversity in 2 tropical pines-*Pinus kesiya* Royle ex Gordon and *Pinus merkusii* Jungh et DeVries. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 436-444.

-- T --

- TAKAHASHI, M., MUKOUDA, M. & KOONO, K. (2000). Differences in genetic structure between two Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) stands. *Heredity* 84, 103-115.
- TAKAHASHI, T., TANI, N., NIIYAMA, K., YOSHIDA, S., TAIRA, H. & TSUMURA, Y. (2008). Genetic succession and spatial genetic structure in a natural old growth *Cryptomeria japonica* forest revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Forest Ecology and Management* 255, 2820-2828.
- THOMPSON, E. A. (1975). Estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics* 39, 173-188.
- TILMAN, D. & KAREIVA, P. (1997). *Spatial Ecology: The Role of Space in Population Dynamics and Interspecific Interactions*, Princeton, NJ.

- TOMITA, M., SAITO, H. & SUYAMA, Y. (2008). Effect of local stand density on reproductive processes of the sub-boreal conifer *Picea jezoensis* Carr. (Pinaceae). *Forest Ecology and Management* 256, 1350-1355.
- TROUPIN, D., NATHAN, R. & VENDRAMIN, G. G. (2006). Analysis of spatial genetic structure in an expanding *Pinus halepensis* population reveals development of fine-scale genetic clustering over time. *Molecular Ecology* 15, 3617-3630.
- TUFTO, J., ENGEN, S. & HINDAR, K. (1997). Stochastic dispersal processes in plant populations. *Theoretical Population Biology* 52, 16-26.

-- *V*--

- VALLANCE, M. (1999). Effet des pratiques sylvicoles sur les ressources génétiques forestières. *Conserver les ressources génétiques forestières en France*. Eric Tessier du Cros coordonateur, Ministère de l'Agriculture et de la pêche, Bureau des Ressources Génétiques, Commission des Ressources Génétiques Forestières, 17-21.
- VARGHESE, M., NICODEMUS, A., NAGARAJAN, B. & LINDGREN, D. (2006). Impact of fertility variation on gene diversity and drift in two clonal seed orchards of teak (*Tectona grandis* Linn.f.). *New Forests* 31, 497-512.
- VEKEMANS, X. & HARDY, O. J. (2004). New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13, 921-935.
- VENDRAMIN, G. G., LELLI, L., ROSSI, P. & MORGANTE, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5, 595-598.
- VENDRAMIN, G. G., ANZIDEI, M., MADAGHIELE, A., SPERISEN, C. & BUCCI, G. (2000). Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 43, 68-78.
- VOCCIA, M. (2005). Approche historique de l'ampleur des flux de graines et de plants de diverses origines génétiques. Cas du pin sylvestre dans deux massifs domaniaux. *Maîtrise de Biologie des Populations et des Ecosystèmes forestiers* Université Henri Poincaré Nancy I. Ardon, ONF-CGAF, 39p.

-- *W*--

- WAGNER, S., WÄLDER, K., RIBBENS, E. & ZEIBIG, A. (2004). Directionality in fruit dispersal models for anemochorous forest trees. *Ecological Modelling* 179, 487-498.
- WALTER, R. & EPPERSON, B. K. (2004). Microsatellite analysis of spatial structure among seedlings in populations of *Pinus strobus* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 91, 549-557.
- 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.

WANG, B. C. & SMITH, T. B. (2002). Closing the seed dispersal loop. Trends in Ecology & Evolution 17, 379-385.

WANG, K. (2003). Genetic diversity and temporal genetic structure in European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica* 52, 100-106.

WANG, T., HAMANN, A., YANCHUK, A., O'NEILL, G. A. & AITKEN, S. N. (2006). Use of response functions in selecting lodgepole pine populations for future climates. *Global Change Biology* 12, 2404-2416.

WEBB, C. J. (1985). Protandry, pollination, and self-incompatibility in *Discaria toumatou*. *New Zealand Journal of Botany* 23, 331-335.

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, Oct13-17, Virginia.

WHEELER, N. C. & JECH, K. S. (1992). The use of electrophoretic markers in seed orchard research. *New Forests* 6, 311-328.

WHITE, T. L., ADAMS, W. T. & NEALE, D. B. (2007a). Within-population variation - genetic diversity, mating systems and stand structure. *Forest Genetics*, 149-186.

WHITE, T. L., ADAMS, W. T. & NEALE, D. B., ed. (2007b). *Forest Genetics*. CABI Publishing, Wallingford.

WNSA, H. (1995). Influence of Rain Shelter and Site Preparation on Seedling Emergence of *Pinus sylvestris* L after Direct Seedling. *Scandinavian Journal of Forest Research* 10, 167-175.

WOODS, J. H., WANG, T. & AITKEN, S. N. (2002). Effects of inbreeding on coastal Douglas fir: nursery performance. *Silvae Genetica* 51, 163-170.

WRIGHT, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28, 114-138.

WYCKOFF, H. & CLARK, J. S. (2005). Tree growth prediction using size and exposed crown area. *Canadian Journal of Forest Research* 35, 13-20.

-- \mathcal{X} --

XIE, C. Y., DANCIK, B. P. & YEH, F. C. (1991). The mating system in natural populations of *Thuja orientalis*. *Canadian Journal of Forest Research* 21, 333-342.

XIE, C. Y. & KNOWLES, P. (1994). Mating system and effective pollen immigration in a Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) plantation. *Silvae Genetica* 43, 48-52.

-- \mathcal{Y} --

YAZDANI, R., MUONA, O., RUDIN, D. & SZMIDT, A. E. (1985). Genetic structure of a *Pinus sylvestris* L. seed-tree stand and naturally regenerated understory. *Forest Science* 31, 430-436.

- YAZDANI, R., LINDGREN, D. & STEWART, S. (1989). Gene dispersion within a population of *Pinus sylvestris*. Scandinavian Journal of Forest Research 4, 295–306.
- 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.

-- Z --

- ZIEGENHAGEN, B., SCHOLZ, F., MADAGHIELE, A. & VENDRAMIN, G. G. (1998). Chloroplast microsatellites as markers for paternity analysis in *Abies alba*. Canadian Journal of Forest Research 28, 317-321.

Annexes

Annexe 1 : Carte des parcelles échantillonnées en forêt de Haguenau pour estimer la diversité génétique

Annexe 2 : Méthode d'extraction d'ADN à partir de cambium

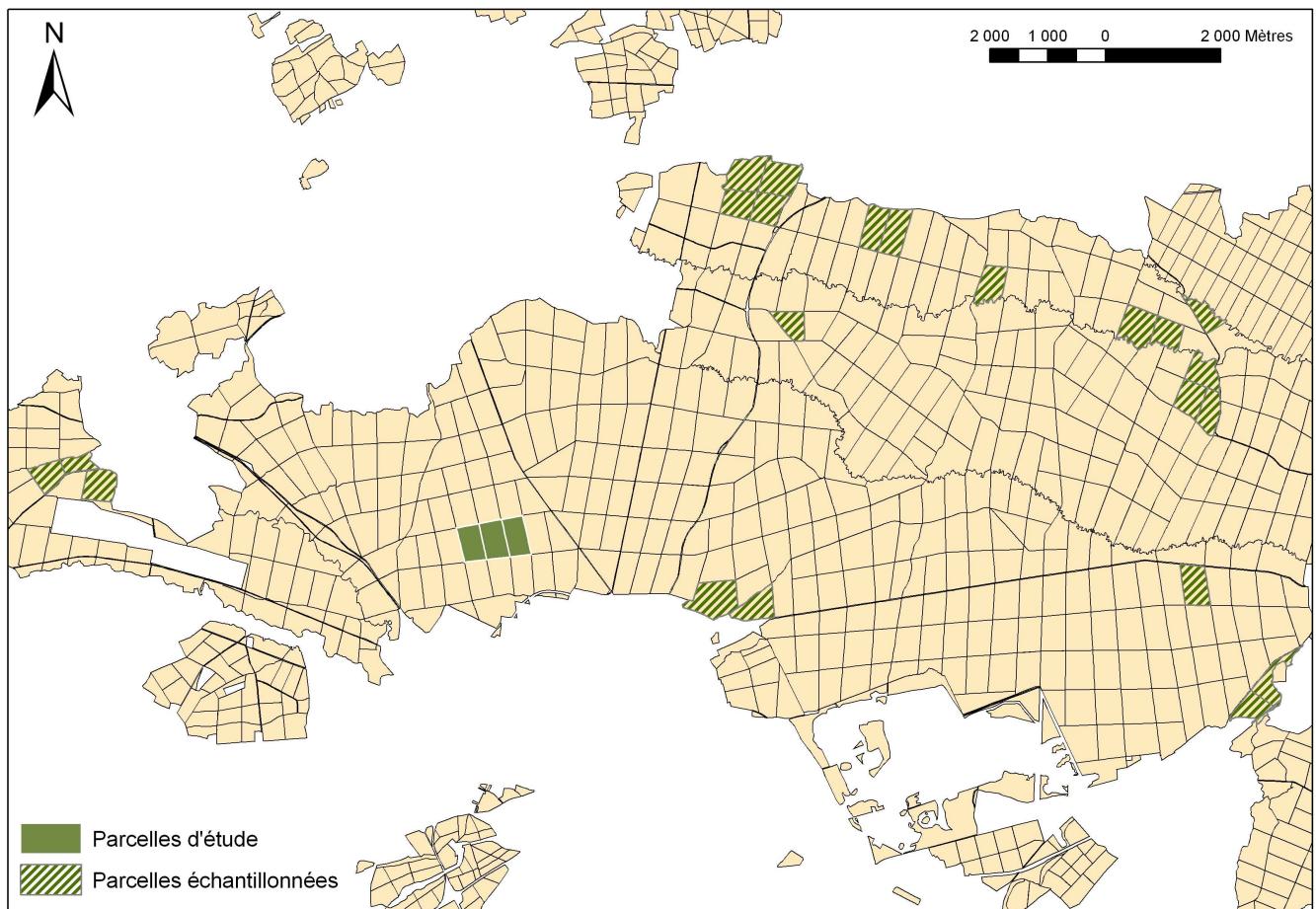
Annexe 3 : Protocoles d'amplification des marqueurs microsatellites utilisés

Annexe 4 : Procédure d'attribution des allèles par fonction de densité

Annexe 5 : Cartes de dispersion efficace du pollen issues des analyses de paternité réalisées à partir des données nucléaires.

Annexe 1

Carte des parcelles échantillonnées en forêt de Haguenau pour estimer la diversité génétique à l'échelle du massif



Annexe 2

*Méthode d'extraction d'ADN à partir de
cambium*

Protocole d'extraction d'ADN à partir du cambium

Kit Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II

Avant de commencer, penser à mettre le bain marie à 65°C

1. Prélever **100 à 120 mg** de cambium (au niveau des deux morceaux qui se séparent lorsque la rondelle de bois décongèle) et couper en petits fragments si possible.
2. Mettre dans des tubes de 2 mL avec 2 billes de tungstène. Broyer **3 à 4 fois à l'agitateur à 23 Hz**.
3. Mettre

-400ul de tampon Pl	1	ou	-300ul PL2
-10ul RNase A			-10ul RNase A
pdt 1h à 65°C		pdt 1h à 65°C	
Puis ajouter 75ul PL3 et 5min à 0°C			
4. Après lyse à 65°C, **mettre le bain marie à 70°C**
5. Centrifuger **2 min à 11 000**, prélever le surnageant et le déposer sur **colonne VIOLETTE**.
6. Centrifuger **2 min à 11 000**.
7. Jeter filtre violet. Ajouter au filtrat **450uL de tampon PC en pipetant 6 à 7 fois pour mélanger**.
8. Mettre **colonne VERTE** sur nouveau tube et déposer le liquide sur la colonne. Centrifuger **1 min à 11 000**. Répéter cette étape si volume supérieur à 700 uL.
9. Jeter le filtrat. Déposer sur filtre **400 uL de PW1**. Centrifuger **1 min à 11 000**. Jeter le filtrat.
10. Déposer **700uL de PW2** et centrifuger **1 min à 11 000**.
11. Déposer **200uL de PW2** et centrifuger **2 min à 11 000** pour sécher la membrane.
12. Déposer le filtre sur un tube de 1.5ml pour éluer. Ajouter **50uL de PE** sur membrane et incuber **5 min à 70°C**. Centrifuger pdt **1 min à 11 000**. Répéter encore une autre fois cette opération.
13. Doser au nanodrop !!!!

NB : Le rendement et la qualité sont nettement meilleurs si l'on double les quantités de PL1, PL2 et PC....

Annexe 3

Protocoles d'amplification des marqueurs microsatellites utilisés

Microsatellite SPAC 7.14

ADN : extraction aiguilles ou cambium

Amplification PCR 1 puits : 1µl Tampon 10 X avec MgCl2 QBiogène
0.15 µl Amorce F (=A) 10µM
0.135 µL Amorce R (=B) 10µM
0.15 µL Amorce R* (=B*) 1µM
0.5 µL dNTP 5 mM
0.1 µL TAQ QBiogène
1 µl à 3 µL Matrice
QSP 10 µL H2O (6.965 pour 1µL de matrice)

Programme PCR :

5 min 94°C

45 s 92°C
45 s 55°C
45 s 72°C } X 35

5 min 72°C

Taillle approximative attendue : 209

Microsatellite SPAC 12.5

ADN : extraction aiguilles

Amplification PCR 1 puits : 1µl Tampon 10 X MgCl₂ Qbiogène ou AB gène
0.15 µl Amorce R 10µM
0.135 µL Amorce F 10µM
0.15 µL Amorce F* 1µM
0.5 µL dNTP 5 mM
0.3 µL TAQ Qbiogène ou AB gène
1 µl à 3 µL Matrice
QSP 10 µL H₂O (6.765 pour 1µL de matrice)

Programme PCR:

5 min 94°C

45 s 92°C
45 s 54°C
45 s 72°C } X 35

5 min 72°C

Taillle approximative attendue : 155

Microsatellite SPAC 12.5

ADN : extraction cambium

Amplification PCR 1 puits : 1µl Tampon 10 X AB gène
0.15 µl Amorce R 10µM
0.12 µL Amorce F 10µM
0.30 µL Amorce F* 1µM
0.5 µL dNTP 5 mM
1.2 µL MgCl2 25mM
0.3 µL TAQ AB gène
1 µl à 3 µL Matrice
QSP 10 µL H2O (4.43 pour 2µL de matrice)

Programme PCR nommé PS 54:

5 min 94°C

45 s 92°C
45 s 54°C
45 s 72°C } X 35

5 min 72°C

Taillle approximative attendue : 155

Microsatellite Ptx3025

ADN : extraction aiguilles ou cambium

Amplification PCR 1 puits : 2.5 µl Tampon 5 X Promega

0.25 µl Amorce F 10µM
0.25 µL Amorce R * 10µM
1 µL MgCl2 25 mM
0.25 µL dNTP 10 mM
0.125 BSA 10mg/mL
0.125 µL TAQ Promega
0.5 Matrice à 100ng/µL
QSP 12.5 µL H2O

Programme PCR nommé PT3025 :

4 min 94°C

45s 94°C
45s 50°C
45s 72°C } X 30

7 min 72°C

Taillle approximative attendue : 200 à 300

Microsatellite ssr-ctg 4363

ADN : extraction aiguilles ou cambium

Amplification PCR 1 puits : 1µl Tampon 10 X avec MgCl2 QBiogène
 0.15 µl Amorce F (=A) 10µM
 0.135 µL Amorce R (=B) 10µM
 0.15 µL Amorce R* (=B*) 1µM
 0.5 µL dNTP 5 mM
 0.1 µL TAQ QBiogène
 1 µl à 3 µL Matrice
 QSP 10 µL H2O (6.965 pour 1µL de matrice)

Programme PCR

4 min 94°C

30 s 94°C
 30 s 60°C (Touch Down -1°C) } X 10
 1min 72°C

30 s 94°C
 30 s 50°C } X 30
 1 min 72°C

10 min 72°C

Taillle approximative attendue :

100

Microsatellites Chloroplastiques

Ptx 26081 +36480 +15169=Multiplexage 1
Ptx 87314+ 30204+71936= Multiplexage 2

ADN : extraction aiguilles ou cambium

Amplification PCR 1 puits :

1ull Tampon 10 QbioX	
0.15*3 μ L Amorce F	10 μ M
0.135*3 μ L Amorce R	10 μ M
0.15*3 μ L Amorce F*	1 μ M
1.2 μ L MgCl ₂	25 mM
0.5 μ L dNTP	5 mM
0.1 μ L TAQ Qbio	
0.2 ul BSA	20mg/mL
1 μ l à 2 μ L Matrice à 10ng/ μ L	
QSP 10 μ L H ₂ O (5.7 pour 1.5 μ L de matrice)	

Programme PCR

4 min 95°C

1 min 94°C	}	1. X 30
1 min 50°C		
1 min 72°C		

10 min 72°C

Taillle approximative attendue : 100 – 140 pb

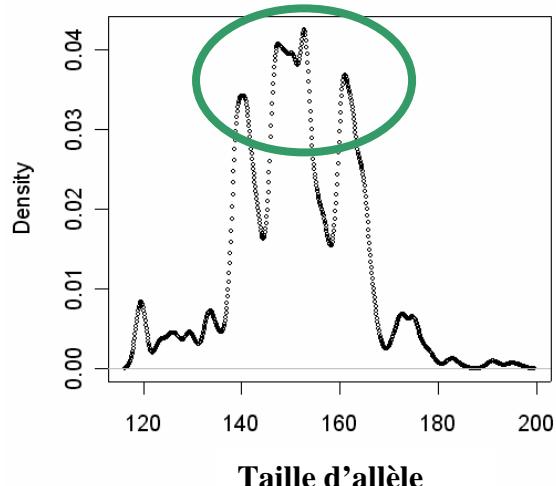
Annexe 4

Procédure d'attribution des allèles par fonction de densité

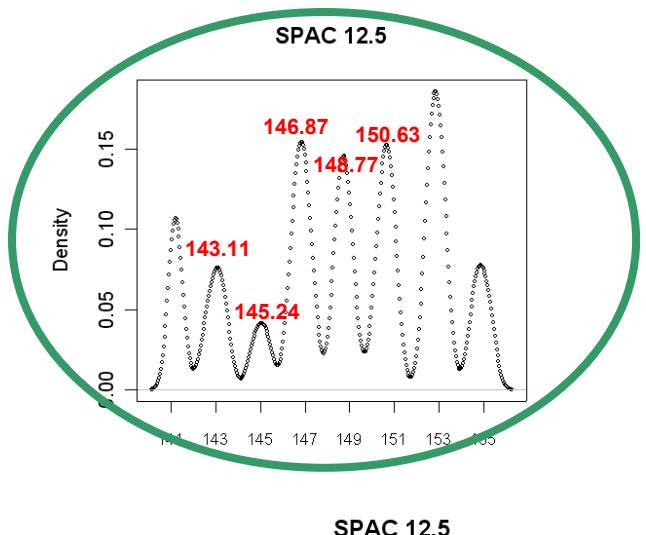
Etape 1 : Génotyper les individus pour obtenir les tailles d'allèles

Individu	Allèle
1	120.0
1	123.82
2	166.66
2	139.07
3	152.6
3.....	

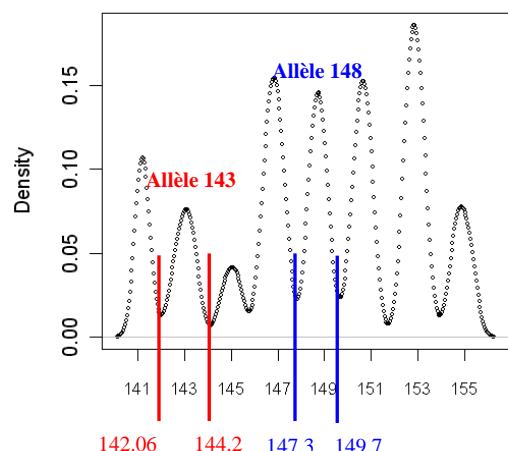
Etape 2 : Représenter la fonction de probabilité de densité du vecteur des tailles d'allèles (exemple du marqueur SPAC 12.5).



Etape 3 : Réduire la fonction de densité pour un range de taille moins large, et vérifier l'incrémentation dans la taille des allèles. Ici d'après le motif microsatellite on attend 2pb.



Etape 4 : Attribution des allèles selon les bornes de la fonction de densité pour chaque allèle. L'allèle 143 est attribué aux individus ayant une taille d'allèle comprise entre 142.06 et 144.2. Cette procédure permet de déterminer à partir de quelle taille à lieu le changement d'allèle.



Annexe 5

Cartes de dispersion efficace du pollen issues des analyses de paternité réalisées à partir des données nucléaires.

Les triangles correspondent aux arbres mères.

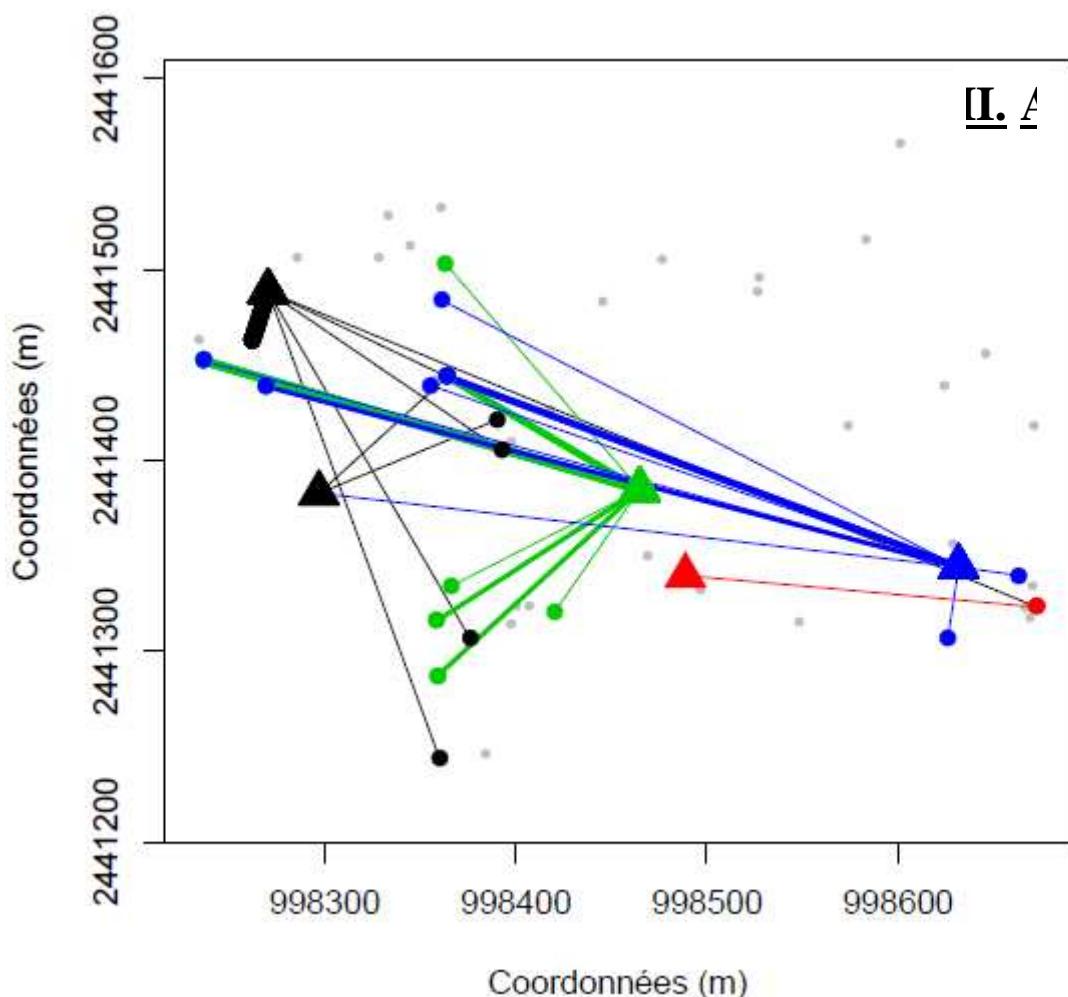
Les traits relient les pères ayant pollinisé la mère, à la mère.

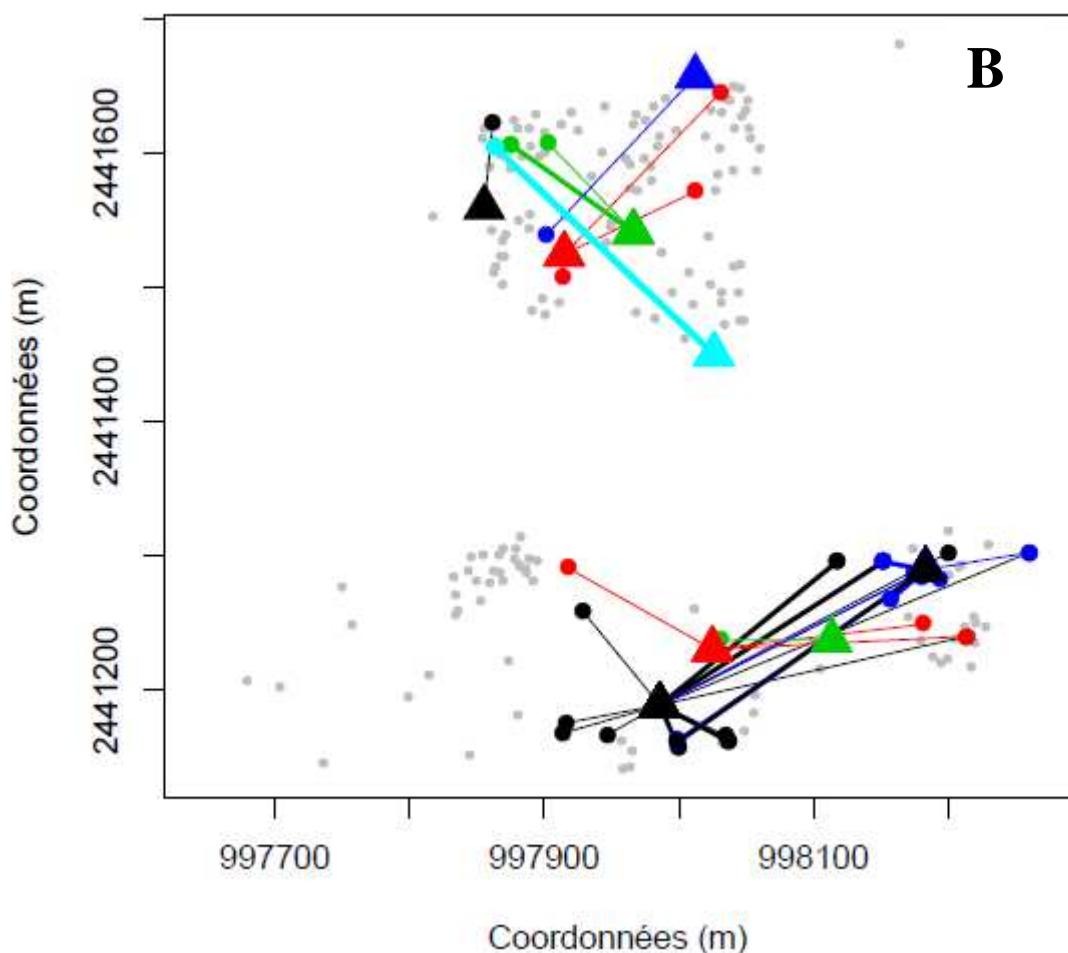
L'épaisseur des traits est proportionnelle aux nombre de pollinisations efficaces du père assigné sur la descendance.

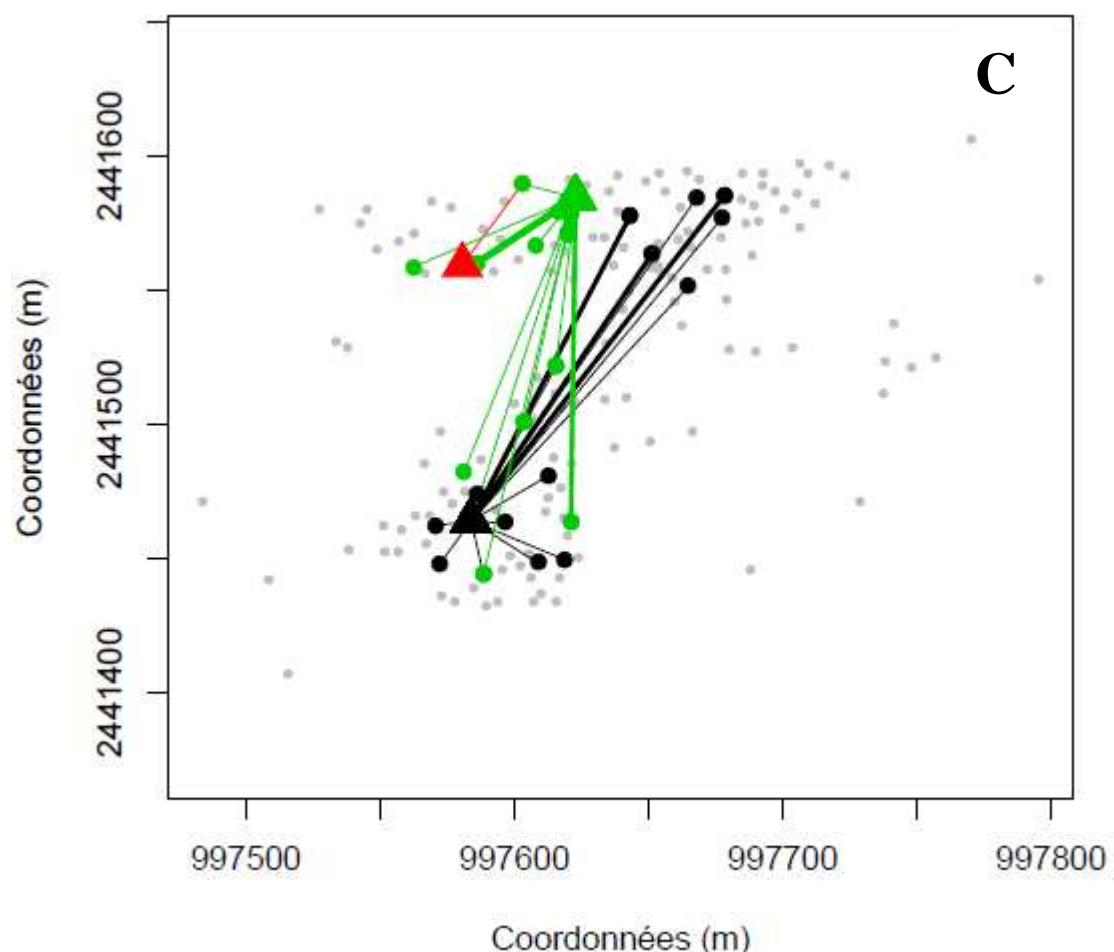
Les points gris représentent les pères potentiels génotypés mais n'ayant engendré aucune graine.

Chaque couleur correspond à un arbre mère.

Les cartes correspondent aux parcelles 1062 (A), 1063 (B) et 1064 (C). Le Nord correspond au haut de chaque carte.







Pascal ASPE

Flux de gènes en phase de régénération chez le pin sylvestre, *Pinus sylvestris* L. : impact de la structure des peuplements reproducteurs à différentes échelles spatiales et conséquences en gestion forestière

La phase de renouvellement constitue l'étape clé de la transmission du patrimoine génétique d'un peuplement forestier et du maintien de sa diversité génétique. Son succès est conditionné par la production de pollen et de graines. Cette thèse s'intéresse à l'impact de la structure des peuplements reproducteurs à différentes échelles spatiales sur les flux de gènes lors de régénération naturelle de pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.). Elle identifie les principaux déterminants de la production quantitative et qualitative de graines à l'échelle d'un peuplement. Nos résultats démontrent la nécessité de prendre en compte, à l'échelle d'un massif forestier, le caractère isolé ou non de l'unité de gestion à régénérer pour évaluer son potentiel fructifère. Dans des peuplements isolés, une production réduite de pollen peut ainsi conduire à une diminution de la production de graines viables et donc à une limitation de la population de semis naturels. Ce phénomène est accru quand les reproducteurs sont eux-mêmes isolés au sein d'un peuplement mélangé chêne-pin. Dans de larges massifs au contraire, la plupart des événements de fécondation sont issus d'un nuage pollinique suffisamment abondant pour ne pas limiter la production de graines. Dans ce cas les échanges polliniques dépassent l'échelle de l'unité de gestion. Il en résulte une faible différenciation des nuages polliniques captés par les différents arbres-mères. Enfin, nos travaux montrent que la dispersion des graines est concentrée dans le temps et se produit majoritairement à moins de 50m des semenciers. Nos résultats sont discutés dans le cadre de la gestion courante des massifs forestiers pour limiter les risques génétiques liés à certaines pratiques sylvicoles. Nous proposons enfin des descripteurs de terrain des principaux déterminants de la production et de la dispersion des graines en vue d'assurer le succès de la régénération naturelle.

Mots clés : Pin sylvestre, flux de gènes, régénération naturelle, gestion forestière, structure du peuplement, échelle spatiale.

Gene flow during natural regeneration for Scots pine, *Pinus sylvestris* L. : impact of reproductive stand structure at different spatial scales and consequences for forest management

Natural regeneration phase is thus the key step of stand renewal in order to maintain its genetic diversity. Its success highly depends on seed production. This study focuses on the impact of structure of reproductive stand at different spatial scales on gene flow during natural regeneration of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). We identify main components of heterogeneity of seed production at stand scale. Moreover our results demonstrate the importance of isolation at landscape level to evaluate seed production potential of management units. In isolated stands, reduced pollen production can lead to limited seed production and consequently to limited seedling production. This phenomenon is even more intense when reproductive trees are isolated within a mixed oak-pine stand. On the reverse within large forest area, most of pollination events are due to the presence of a pollen cloud huge enough to ensure a non-limited seed production. In such a situation, pollen flow occurs at wider spatial scale than the management unit one. As a result, we observed a non significant differentiation of pollen clouds captured by mother trees. We found that duration of seed deposition process is short and seed dispersal mainly occurs at less than 50m from the seed trees. Our results are discussed within the context of current forest management in order to limit genetic risks linked to some sylvicultural practices. We also propose to forest managers field descriptors of important determinants of seed production and dispersal for successful natural regeneration.

Key words: Scots pine, gene flow, natural regeneration, forest management, stand structure, spatial scale.