



# Évolution du genre sexuel et de la diversité génétique dans une succession primaire : l'étude d'Antirhea Borbonica (rubiaceae) sur les coulées de lave à la Réunion

Isabelle Litrico

## ► To cite this version:

Isabelle Litrico. Évolution du genre sexuel et de la diversité génétique dans une succession primaire : l'étude d'Antirhea Borbonica (rubiaceae) sur les coulées de lave à la Réunion. Ecologie, Environnement. Université de la Réunion, 2004. Français. NNT : 2004lare0025 . tel-00545826

**HAL Id: tel-00545826**

**<https://theses.hal.science/tel-00545826>**

Submitted on 13 Dec 2010

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

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

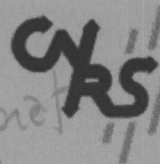


UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION  
Faculté des Sciences et Technologies

Peuplements végétaux et Bioagresseurs  
en milieu tropical

TH 308

exclu du prêt



CENTRE NATIONAL  
DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive  
Dynamique des Systèmes Ecologiques  
Montpellier

## THESE

Présentée à l'Université de La Réunion  
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences

Spécialité : Biologie des Populations et Ecologie  
Formation Doctorale : Biologie de l'Evolution et Ecologie  
Ecole Doctorale : Interdisciplinaire de La Réunion

# EVOLUTION DU GENRE SEXUEL ET DE LA DIVERSITE GENETIQUE DANS UNE SUCCESSION PRIMAIRE : L'ETUDE D'ANTIRHEA BORBONICA (RUBIACEAE) SUR LES COULEES DE LAVE A LA REUNION

**Isabelle LITRICO**

Soutenue le 26 novembre 2004 devant le jury composé de

|                         |                                                                   |                    |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Mme Irène Till-Bottraud | Directeur de Recherche : CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble | Rapporteur         |
| M. Joël Cuguen          | Professeur : Université de Lille I, Lille                         | Rapporteur         |
| M. Bernard Delay        | Directeur de Recherche : CEFCE-CNRS, Montpellier                  | Examineur          |
| M. Thierry Pailler      | Maître de Conférence : Université de La Réunion, La Réunion       | Examineur          |
| M. Dominique Strasberg  | Professeur : Université de La Réunion, La Réunion                 | Examineur          |
| M. John D. Thompson     | Directeur de Recherche : CNRS-CEFCE, Montpellier                  | Directeur de Thèse |

SCD UNIVERSITE DE LA REUNION



266488 0350



UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION  
Faculté des Sciences et Technologies

*Peuplements végétaux et Bioagresseurs  
en milieu tropical*



CENTRE NATIONAL  
DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

*Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive  
Dynamique des Systèmes Ecologiques  
Montpellier*

## THESE

Présentée à l'Université de La Réunion  
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences

Spécialité : Biologie des Populations et Ecologie

Formation Doctorale : Biologie de l'Evolution et Ecologie

Ecole Doctorale : Interdisciplinaire de La Réunion

# EVOLUTION DU GENRE SEXUEL ET DE LA DIVERSITE GENETIQUE DANS UNE SUCCESSION PRIMAIRE : L'ETUDE D'*ANTIRHEA BORBONICA* (RUBIACEAE) SUR LES COULEES DE LAVE A LA REUNION

**Isabelle LITRICO**

Soutenue le 26 novembre 2004 devant le jury composé de



|                         |                                                                   |                    |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Mme Irène Till-Bottraud | Directeur de Recherche : CNRS-Université Joseph Fourier, Grenoble | Rapporteur         |
| M. Joël Cuguen          | Professeur : Université de Lille I, Lille                         | Rapporteur         |
| M. Bernard Delay        | Directeur de Recherche : CEFÉ-CNRS, Montpellier                   | Examineur          |
| M. Thierry Pailler      | Maître de Conférence : Université de La Réunion, La Réunion       | Examineur          |
| M. Dominique Strasberg  | Professeur : Université de La Réunion, La Réunion                 | Examineur          |
| M. John D. Thompson     | Directeur de Recherche : CNRS-CEFÉ, Montpellier                   | Directeur de Thèse |

Avant de rentrer dans le cœur du sujet de cette thèse je tiens à remercier, les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide. Sans oublier,

Mon Directeur de thèse, John D. Thompson, qui a rendu ce projet réalisable. Je le remercie chaleureusement de m'avoir fait confiance et d'avoir fait preuve d'une grande disponibilité et cela depuis mon année de licence...

Thierry pailler qui m'a fait découvrir les petits *Antirhea* sur les coulées de lave, souvent dans des conditions difficiles, et qui a toujours porté un grand intérêt à mon travail. Sandrine Maurice, "la douée des équations" qui, avec bonne humeur, a passé des heures sur MATHEMATICA pour m'aider à résoudre mes problèmes et dont l'esprit critique m'a éclairée plus d'une fois.

Max Debussche, Pierre Olivier Cheptou, Thomas Lenormand avec lesquels les discussions étaient toujours intéressantes et fructueuses.

Marie Hélène Chevalier, Florence Nicole et Aurélie Bonin pour m'avoir aidée dans le choix des logiciels de génétique. L'équipe des marqueurs moléculaires du CEFÉ à Montpellier et du Pôle de Protection des Plantes de La Réunion, particulièrement Emmanuel Jouen et Emmanuelle Chapier qui ont toujours été d'accord pour mettre la main à la patte quand j'étais plus que speedée!

Marie Maistre, Anabelle Dos Santos et Gérard Lebreton, pour avoir transpiré à mes cotés à compter le nombre de fleurs, de fruits, de nœuds....de ces satanés *Antirhea* ! Ainsi que Christian Colin, Violette et David du terrain d'expérience au CEFÉ pour avoir pris soins de mes plantations.



**Geneviève Debussche** et **Gérard Banco**, nos génies de l'informatique ! Sans oublier toute l'équipe de l'administration du CEFE, **Karine**, **Viviane**, **Maryse**, **Hélène**, **Anne Marie** et **Danièle** qui ont toujours été super sympas et disponibles.

Je tiens aussi à remercier du fond du cœur **Marie** et **Jean Marie Leroux** pour m'avoir accueillie chez eux durant de longs mois, ainsi que pour l'amitié qu'ils me témoignent.

Je remercie aussi **Adeline Césaro**, **Justin Amiot** pour leur soutien et la bonne humeur qui régnait dans notre bureau, sans oublier **Sylvain Allombert** avec qui j'ai partagé tant de paquets de kleneex et de "crises de nerfs du week end" pendant la rédaction de ce mémoire. Je remercie aussi **Hélène Frérot** pour avoir partagé mes pauses café, les moments de joie et de désespoir. Tu vois **Hélène**, on s'en est sorti !

Je remercie aussi toute l'équipe du 3P, **Philippe**, **Annie**, **Karine**, **Kenny**, **Lolo** et **Ber**, **Fred**, avec lesquels j'ai passé de supers soirées même si **Jérémie** finissait toujours endormi sur le canapé !

Je remercie tout particulièrement **ma famille** notamment **ma marraine** pour m'avoir soutenue et surtout **mes parents** qui ont toujours cru en moi et qui m'ont permis, grâce à leur amour et leurs encouragements, d'arriver jusque là.

Enfin, je tiens à remercier **Jérémie**, qui a su se montrer patient et attentionné à chaque fois que j'en ai eu besoin, je le remercie de m'avoir supportée lors de mes moments "c'est pas la journée" et qu'est ce qu'ils ont été nombreux ces moments là !

*A ma Grand-mère Julia,*

# SOMMAIRE

|                                                                            |                |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>INTRODUCTION</b>                                                        | <b>p1</b>      |
| Contexte général                                                           | p2             |
| Colonisation, stades successionnels et genre sexuel des espèces pionnières | p4             |
| Dynamique de colonisation : ses conséquences génétiques                    | p9             |
| Volcanisme et succession primaire                                          | p11            |
| L'archipel des Mascareignes et l'île de La Réunion                         | p12            |
| <i>Antirhea borbonica</i> : un modèle de choix                             | p14            |
| Objectifs et plan de la thèse                                              | p15            |
| <br><b>CHAPITRE I. VARIATIONS DES TRAITS LIES A LA REPRODUCTION</b>        | <br><b>p17</b> |
| I. Introduction                                                            | p18            |
| II. Expérimentations                                                       | p19            |
| 1. Morphologie florale                                                     | p20            |
| 2. Sexe ratio                                                              | p20            |
| 3. Fécondité, masses de graines et germination                             | p20            |
| 4. Effet des ressources sur les fonctions reproductives des individus      | p21            |
| III. Résultats                                                             | p22            |
| 1. Morphologie florale                                                     | p22            |
| 2. Sexe ratio                                                              | p23            |
| 3. Fécondité, masses de graines et germination                             | p24            |
| 4. Effet des ressources sur les fonctions reproductives des individus      | p26            |
| IV. Discussion                                                             | p28            |

|                                                                                       |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>CHAPITRE II. EVOLUTION DU SYSTEME DE REPRODUCTION :<br/>ROLE DE LA COMPETITION</b> | <b>p33</b>     |
| I. Introduction                                                                       | p34            |
| II. Autocompatibilité                                                                 | p36            |
| III. Compétition entre plantules                                                      | p 37           |
| IV. Etude théorique                                                                   | p38            |
| 1. Hypothèses et paramètres                                                           | p38            |
| 1. Fonctions et équations utilisées                                                   | p40            |
| 2. Les cas étudiés                                                                    | p41            |
| 3. Résultats                                                                          | p42            |
| V. Discussion                                                                         | p43            |
| <br><b>CHAPITRE III STRUCTURATION GENETIQUE DANS<br/>UNE SUCCESSION PRIMAIRE</b>      | <br><b>p48</b> |
| I. Introduction                                                                       | p50            |
| II. Méthodes et résultats                                                             | p51            |
| 1. Plan d'échantillonnage et génotypage                                               | p51            |
| 2. Diversité génétique intra population                                               | p52            |
| 3. Différenciation des populations                                                    | p52            |
| 4. Isolement par la distance                                                          | p53            |
| 5. Tests d'assignations                                                               | p54            |
| III. Discussion                                                                       | p54            |
| <br><b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>                                                | <br><b>p60</b> |
| <br><b>BIBLIOGRAPHIE</b>                                                              | <br><b>p66</b> |

# INTRODUCTION

## *Contexte général*

Les perturbations, d'origine anthropique (déforestation, urbanisation, mise en culture des sols) ou naturelle (volcanisme, incendie), entraînent la destruction et la fragmentation des habitats naturels. En conséquent, leur impact est déterminant sur le fonctionnement des populations naturelles et la survie des espèces. Les perturbations ont deux conséquences fondamentales. (i) La variation des conditions du milieu et donc des pressions de sélection locales, après une destruction de l'habitat. Face à des changements de milieu, les espèces doivent faire preuve d'une certaine capacité d'adaptation pour s'installer et persister. (ii) Une modification de la taille et de l'organisation spatiale des populations sous l'effet de la fragmentation, ce qui peut altérer les flux géniques et entraîner une variation de la diversité génétique. L'impact des perturbations sur la biologie, l'écologie et la génétique d'une espèce va donc dépendre du niveau et de l'intensité de fragmentation, qui conditionnent la taille efficace de la population ainsi que les flux migratoires entre les patchs d'habitats résiduels. Cette thèse s'articule autour de ces deux conséquences fondamentales, la biologie et la dynamique des populations en milieu perturbé constituent le cœur de cette étude.

La capacité de colonisation est primordiale dans les milieux perturbés où elle constitue très souvent, une condition nécessaire au maintien de l'espèce. Il apparaît clairement que dans des milieux perturbés, la compréhension des mécanismes régissant la colonisation et ses conséquences génétiques ainsi que la capacité des espèces à s'adapter à un nouvel environnement, constitue un enjeu fondamental.

La colonisation est un processus qui concerne tous les organismes vivants. Elle peut avoir lieu sur de longues distances comme dans le cadre de la colonisation d'îles, ou sur des distances plus réduites comme à l'échelle d'une métapopulation. Si des perturbations régulières, engendrant des cycles d'extinction, détruisent et fragmentent les habitats, il se crée alors, des occasions de colonisation. Lorsque les extinctions-colonisations ont lieu de façon récurrente avec une évolution indépendante des populations qui se fondent les unes à partir des autres, la sélection peut alors agir

non pas au niveau populationnel mais au niveau de la métatopulation (Couvét *et al.* 1985).

Lorsque la destruction des habitats met à nu le substrat et qu'il n'existe aucune banque de semence, la colonisation des sites constitue une série de successions primaires. On entend par succession primaire, la colonisation d'un substrat stérile dans le temps par un cortège d'espèces. Les premiers stades de succession primaire sont des stades stressants (Miles & Walton 1993) et l'amélioration du milieu au cours du temps semble être primordiale pour l'installation des espèces (Wood & Del Moral 1987, Del Moral 1993). Plusieurs étapes dans la colonisation apparaissent essentielles. Chez les organismes sédentaires, comme les plantes, il est nécessaire tout d'abord que la propagule arrive sur le site vacant, puis les conditions du milieu doivent permettre la germination de la graine. Ensuite, l'individu doit atteindre l'âge adulte, se reproduire et établir une population. Enfin, pour faire face aux changements du milieu, inévitables lors de successions primaires, et perdurer, les individus devront faire preuve de capacité d'adaptation. Ces capacités d'adaptation sont traduites soit par une variabilité génétique permettant une adaptation locale, soit par une plasticité phénotypique qui permet à un génotype donné d'être viable si l'environnement change. La plasticité phénotypique est définie comme l'expression variable d'un génotype en fonction de conditions environnementales particulières, elle pourrait avoir un grand rôle dans le maintien des espèces lors de changements environnementaux (Sultan 1987 1995, Thompson 1991). Le long de la succession, l'environnement change et il est fréquent de voir un changement de cortège floristique avec des espèces ayant des traits biologiques et écologiques adaptés à l'environnement. Ces considérations prennent toute leur importance chez les espèces pionnières longévives pour lesquelles les individus peuvent persister le long du gradient de succession.

Durant ma thèse, je me suis intéressée à l'impact de perturbations naturelles récurrentes sur le fonctionnement des populations dans une succession primaire, en termes de variations des traits biologiques liés à la reproduction et de conséquences génétiques de la dynamique de colonisation. Les objectifs de cette étude sont d'étudier la variabilité du système de reproduction et son caractère adaptatif et

d'évaluer comment, dans une succession primaire, le système de reproduction et les processus écologiques associés à la colonisation contribuent à la structuration de la diversité génétique. Pour mener à bien ces objectifs, nous avons choisi d'effectuer une étude sur un arbre pionnier des coulées de lave à La Réunion.

*Colonisation, stades successionnels et genre sexuel chez les espèces pionnières*

Le système de reproduction joue un rôle prépondérant dans l'installation et la persistance des populations. Deux situations semblent favoriser l'hermaphrodisme dans les jeunes stades récemment colonisés.

D'une part, l'assurance à la reproduction pourrait favoriser la sélection d'hermaphrodisme. Par exemple, lors de la colonisation longue distance, une fois l'individu arrivé sur le site il faut, après qu'il ait atteint sa taille adulte, qu'il puisse se reproduire pour fonder une population. Si l'espèce est dioïque c'est à dire composée d'individus unisexués (des mâles et des femelles), l'individu devra "trouver" un conspécifique du sexe opposé. Dans ces conditions, si le taux de dispersion est faible, la fondation de la population peut être compromise, il est alors aisé de comprendre que l'hermaphrodisme sera favorisé en terme d'assurance à la reproduction (Baker 1955 1967). Dans la colonisation sur de plus courtes distances, Pannell (1997) et Pannell & Barrett (1998), dans un contexte de métapopulation, prédisent que des variations du système de reproduction seraient avantageuses en termes d'assurance à la reproduction. En effet, sur les sites récemment colonisés les individus hermaphrodites seraient favorisés alors que sur des sites plus âgés où la probabilité de rencontrer un partenaire sexuel est plus élevée, les individus unisexués seraient sélectionnés sous l'influence de la dépression de consanguinité. Mais l'hypothèse de l'assurance à la reproduction ne peut se vérifier que si le taux de dispersion est tel que la probabilité de rencontrer un partenaire sexuel est faible.

D'autre part, lors de la colonisation, lorsque les individus sont arrivés sur le site, il faut considérer l'expansion de la population. Sous l'effet du "*seed shadow*



*handicap*" (Encadré i.1), les espèces dioïques seraient défavorisées par rapport aux hermaphrodites (Heilbuth *et al.* 2001). Ainsi, l'hermaphrodisme est attendu dans les sites récemment colonisés.

A l'opposé de l'hermaphrodisme, la dioécie constitue le taux de spécialisation le plus élevé du genre sexuel. Chaque individu assurant la transmission de ses gènes soit via la voie femelle (graine), soit via la voie mâle (pollen). Mais dans la nature, les choses ne sont pas aussi simples, la dioécie est rarement stricte. Elle ne correspond pas toujours à une unisexualité nette et tranchée des individus, notamment chez les plantes où la reproduction peut être très complexe et dépendante de contraintes génétiques, physiologiques et environnementales. Par exemple, si l'on s'intéresse aux espèces dites sub-dioïques (sub-dioécie), les femelles se reproduisent uniquement en produisant des graines alors que les mâles, en plus de leur production de pollen, sont capables de produire quelques fruits. Charnov & Bull (1977) énoncent que le déterminisme du sexe pourrait être environnemental et cela aussi bien au sein d'hermaphrodites ayant la capacité de faire varier leur ratio pollen/ovule, qu'au sein d'espèces où les individus seraient mâle ou femelle en fonction des pressions de sélection du site. Ces possibilités font percevoir un caractère adaptatif du sexe et de sa variation.

Nous avons défini les successions primaires comme la colonisation de sites dont le substrat est complètement nu, les séries de successions primaires sont donc particulièrement sujettes à des variations de milieu au cours du temps. L'hétérogénéité environnementale des stades successionnels pourrait favoriser la plasticité chez les espèces longévives. A Hawaii, un arbre pionnier de la famille des Myrtaceae montre une variation de la morphologie des feuilles (glabres ou pubescentes) en fonction du stade successional, cette variation pourrait traduire une réponse adaptative à un taux d'humidité du sol différant entre les stades (Drake & Mueller-Dombois 1993). Chez les espèces pionnières, la plasticité phénotypique le long des successions primaires pourrait aussi jouer un rôle important dans l'aptitude à la compétition et la persistance (Gray 1993, Thompson *et al.* 1993). Il semble que les espèces de fin de succession possèdent fréquemment des graines plus grosses que les

espèces de début de succession (Baker 1972, Chapin 1993). Bien que cela ~~est~~ loin <sup>sûr</sup> d'être général (Rydin & Borgegard 1991), au niveau intra-spécifique une augmentation de la masse de graines avec l'âge du stade successional pourrait augmenter l'aptitude à la compétition.

Mais en dépit du fait que les séries de successions primaires, qui associent colonisation de sites vacants et hétérogénéité des habitats, constituent des cas idéaux pour l'étude de la variation des traits biologiques, peu d'études empiriques ont été faites sur les variations et l'évolution intra-spécifiques des traits biologiques dans un tel système. De plus, compte tenu des étapes de colonisation et des phénomènes de persistance, il semble intéressant de se préoccuper du patron de variation du genre sexuel des individus le long d'une succession primaire. De nombreuses études ont mis en évidence une variation de l'expression de la dioécie au sein d'une même espèce. Par exemple, Barrett (1992) montre que les populations de *Wurmbea dioica* sont monomorphes en milieu humide et dioïques en milieu sec et moins riche, de même Costich (1995) montre que les populations d'*Ecballium elaterium* sont dioïques dans les habitats secs et monoïques dans les habitats moins stressants, ou encore plus récemment Humeau *et al.* (2000) montrent qu'à La Reunion, *Dombeya ciliata*, un arbre des forêts primaires est subdioïque en basse altitude alors que les populations en limite d'aire de distribution en altitude sont dioïques. Ces observations soulignent que les conditions environnementales, notamment les ressources, pourraient jouer un rôle clé dans l'expression du genre sexuel des individus. Certaines études (Charnov *et al.* 1976, Charnov 1982, Charlesworth 1999) prédisent d'ailleurs l'unisexualité en ressources limitées et un glissement vers l'hermaphrodisme en milieu plus riche. Mais alors que les tendances observées dans les études empiriques confortent ces prédictions, aucun test expérimental permettant la mise en évidence de l'influence directe des ressources sur la variation du genre sexuel n'a été fait en populations naturelles à notre connaissance.

Dans un contexte de colonisation, l'effet du "*seed shadow handicap*" des espèces dioïques et l'assurance à la reproduction peuvent donc entraîner la sélection de l'hermaphrodisme sur les stades récemment colonisés. Puis avec le temps, les

pressions de sélection changent et sous l'effet de la dépression de consanguinité, l'unisexualité des individus peut être favorisée (Charlesworth & Charlesworth 1978). Mais si le genre sexuel est sous la dépendance du niveau de ressources, alors dans le cadre de succession primaire, la faible disponibilité des ressources sur les jeunes sites conduit les individus à l'unisexualité lors de la colonisation. Puis sous l'effet de la plasticité, lorsque les conditions de milieu s'améliorent avec notamment une augmentation en ressources sur les stades tardifs de la succession, les individus alloueront leurs ressources aux deux fonctions sexuelles. Par exemple, chez les espèces sub-dioïques, les mâles peuvent allouer une partie variable de leurs ressources à la fonction femelle. Ainsi, les mâles inconstants qui développent une fonction femelle en plus de leur fonction mâle pourraient être avantagés face aux mâles stricts et aux femelles, et leur fréquence devrait augmenter dans les vieux stades de la succession. Dans ce contexte, la plasticité du genre sexuel serait adaptative et pourrait être sélectionnée à l'échelle de la population.

Mais il est fréquent de voir que les individus dont le genre sexuel est inconstant, donc les mâles chez les espèces subdioïques, produisent moins de fruits que les femelles pures et leurs graines sont souvent de moins bonne qualité (Wolfe & Schmida 1997). Cette tendance est aussi observée chez les hermaphrodites des espèces gynodioïques (Delph 1990, Ashman 1994, Thompson & Tarayre 2000). Par exemple, chez *Thymus vulgaris*, nous avons montré (Annexe 1) que les descendants issus des hermaphrodites possèdent une valeur sélective inférieure aux descendants issus des femelles. Sous ces conditions, il est moins évident de comprendre l'avantage, face à une femelle, d'un mâle qui investit une partie de ses ressources à la fonction femelle.

Mais, certains facteurs, comme la compétition entre plantules, pourraient diminuer le bénéfice d'une grande production de graines. En effet, si les femelles produisent beaucoup plus de graines que les hermaphrodites alors, il est possible que le nombre de descendants aux pieds des femelles soit plus important que le nombre de descendants au pied des hermaphrodites. Dès lors, la compétition entre plantules serait plus forte pour les plantules issues de femelles que pour celles issues de mâles

inconstants ou d'hermaphrodites. En considérant cet argument, il est possible de comprendre comment la compétition entre plantules pourrait favoriser ou défavoriser certains morphes de la population au niveau intra-spécifique. Cette pression de sélection contre les femelles pourrait entraîner une compensation du faible nombre et de la moins bonne valeur sélective des graines des mâles inconstants chez les espèces subdioïques. Ainsi, cette inconstance du genre sexuel des mâles pourrait être maintenue.

Chez les espèces ornithochores et le long de successions primaires, les phénomènes de compétition entre plantules pourraient être particulièrement importants, et cela aussi bien en intra qu'en inter-spécifique. Premièrement, la dispersion des graines des espèces ornithochores est fortement liée au comportement des oiseaux (Janzen 1983), l'endroit où ils se nourrissent, où ils trouvent refuge, où ils se perchent. Plusieurs études ont reporté le dépôt de la majorité des fruits sous les adultes conspécifiques ou sous les adultes d'autres espèces (Desbussche *et al.* 1985, Izhaki *et al.* 1991, Debussche & Isenmann 1994). Deuxièmement, l'attraction des disperseurs pourrait être corrélée avec la production de fruits, et plus les visites d'oiseaux sont fréquentes, plus (i) le nombre de graines déposées à proximité de la canopée pourraient être important et (ii) la dispersion pourrait augmenter. Enfin, le long de successions primaires, la compétition interspécifique pourrait augmenter avec l'âge du stade successional (Parrish et Bazzaz 1979, Callaway & Walker 1997). On peut ainsi s'attendre à ce que la compétition intra et inter spécifique entre plantules issues de femelles soit plus importante que pour les plantules issues d'hermaphrodites ou de mâles inconstants et qu'elle augmente avec l'âge du stade successional. En conséquent, investir une partie des ressources dans la fonction femelle en fin de succession pourrait être avantageux pour les mâles inconstants par rapport aux femelles et aux mâles stricts. Dans ce type de situation, la plasticité phénotypique serait adaptative, en termes de réponse aux changements de milieu. Elle constituerait un élément majeur dans la persistance de l'espèce. Mais dans ce contexte, comment cette plasticité influencerait l'évolution du système de reproduction ? Quelles seraient les fréquences des différents morphes en l'absence de contrainte génétique sur le

déterminisme du sexe, si le niveau de ressources est variable et que la production, la viabilité des graines et la compétition entre plantules sont différentes entre les morphes ?

### *Dynamique de colonisation : ses conséquences génétiques*

Nous avons vu que le succès de la colonisation et de la persistance des espèces peut être conditionné par le système de reproduction, mais nous n'avons pas encore abordé l'aspect génétique de la colonisation. La dynamique de colonisation, qui est en relation étroite avec les traits d'histoire de vie et le système de reproduction des espèces influence profondément l'organisation de la variabilité génétique dans le temps et dans l'espace. Cette influence est d'autant plus importante que les épisodes d'extinction et de colonisation sont fréquents (Barrett & Husband 1989, Whitlock & McCauley 1990, Husband & Barrett 1996). Dans des habitats régulièrement perturbés où les taux d'extinction et de colonisation sont élevés, les effets de la colonisation sur la structure génétique pourront donc être considérables. L'étude de la distribution spatiale de la variabilité génétique fournit de précieux renseignements sur l'histoire et la migration des populations.

Lors de perturbations récurrentes et lors de série de succession, la structure génétique des populations peut varier d'un site à l'autre en fonction de l'isolement et sous l'influence des phénomènes d'adaptation locale. Mais il est rare que les populations soient totalement isolées les unes des autres et les flux migratoires tendent à l'homogénéisation, notamment lorsqu'on s'intéresse à des portions neutres du génome. Un équilibre migration-dérive peut être atteint. Mais, il faut d'ores et déjà, noter que les patrons et l'intensité des flux migratoires sont associés à la biologie et l'écologie des espèces ainsi qu'au nombre de sites ou microsites favorables à l'établissement des individus. D'où l'importance de considérer les processus écologiques ayant cours lors de la colonisation et l'établissement des populations pour comprendre la dynamique de colonisation et ses conséquences génétiques.

De nombreuses études théoriques ont prédit les conséquences génétiques des événements de colonisation (Slatkin 1977 1993, Wade & McCauley 1988, Whitlock & McCauley 1990, Austerlitz *et al.* 1997 2000, Le Corre & Kremer 1998). Alors qu'il est couramment admis que sous l'effet de l'extinction et de la colonisation, la variabilité intra-populationnelle diminue et la différenciation génétique des populations augmente via les occasions de dérive génétique que créent les goulots d'étranglement et les événements de fondations, Slatkin (1977), Wade & McCauley (1988) et McCauley (1991) montrent que sous certaines conditions, les phénomènes d'extinction-colonisation n'agissent pas toujours dans ce sens. Deux modèles de base (Slatkin 1977) concernent l'impact de la dynamique de colonisation sur la structure génétique : le "propagule pool model" et le "migrant pool model". Contrairement au premier modèle qui s'applique à la situation où les propagules colonisatrices proviennent d'une seule source et entraînent une forte différenciation des populations nouvellement fondées, le second modèle se rapporte à de multiples origines des individus fondateurs (un nombre constant de propagules issues de chaque population source) produisant une faible différenciation des populations.

Dans la nature, il est peu probable que les choses soient aussi simples et l'équilibre migration-dérive est rarement atteint dans les populations naturelles, en particuliers lorsque les extinctions sont fréquentes et aléatoires. Certains auteurs (Wade & McCauley 1988, Whitlock & McCauley 1990, McCauley 1991), intégrant les phénomènes d'extinction, montrent que la différenciation des populations dépend fortement de la composition des groupes fondateurs qui conditionne la taille efficace de la population. Le nombre et l'origine des individus fondateurs, l'apparentement de ces individus c'est-à-dire la "*kin structured colonisation*" (Wade & McCauley 1988, Ingvarsson 1998), le sex ratio, ainsi que l'hétérogénéité intra-patch, sont des facteurs primordiaux. L'effet de la dynamique de colonisation sur la structuration génétique est donc une résultante complexe de ces facteurs. Ces facteurs sont variables en fonction des organismes et des situations considérées. Par exemple, chez les plantes, la dispersion se fait souvent par des fruits contenant plusieurs graines ce qui augmente le niveau d'apparentement des migrants (Levin 1988) entraînant une

réduction de la taille effective des groupes de fondateurs (Whitlock & McCauley 1990). Ou encore sur les premiers stades de succession primaire, seuls quelques microsites peuvent être favorables à l'installation, ce qui entraîne une certaine structuration spatiale et une limitation du nombre d'individus recrutés.

Dans les situations où les populations soumises à des cycles d'extinction-colonisation se fondent les une à partir des autres au cours du temps (métapopulation), les populations sont structurées en âge. Attendu que les événements de fondation peuvent entraîner une différenciation des populations (Slatkin 1997), certains auteurs (Whitlock & McCauley 1990, McCauley *et al.* 1995, Giles & Goudet 1997), montrent que les populations nouvellement fondées sont ou pourraient être plus différenciées entre elles que ne le sont les populations plus âgées. Tenir compte de la structure en âge des populations permet ainsi une meilleure compréhension des conséquences génétiques de la dynamique de colonisation.

Bien que (i) les gradients de successions primaires correspondent clairement à une structuration en âge des populations, que (ii) les principaux facteurs limitant l'établissement des populations végétales lors des successions primaires sont la dispersion (Del Moral 1993, Lichter 2000) et la disponibilité des microsites favorables, que (iii) l'hétérogénéité intra-site, fréquente dans les successions primaires, pourrait entraîner une structuration à petite échelle (Callaway *et al.* 1990, Del Moral 1993, Bertness & Callaway 1994), peu d'études (except Giles & Goudet 1997) se sont attachées à déterminer la distribution spatiale de la variabilité génétique des métapopulations le long de successions primaires (Husband & Barrett 1996).

### ***Volcanisme et succession primaire***

Les habitats fragmentés de façon répétée par les coulées de lave, constituent une situation correspondant à un système de métapopulation couplée à des séries de successions primaires. En effet, lorsque les flux de lave détruisent les habitats et

entraînent l'extinction des populations, le substrat constitué de lave brute est dépourvu de banque de graine et bien entendu de sol. Les conditions sont très stressantes et à ce stade aucun végétal ne peut s'établir. Les premiers organismes à coloniser ces sites sont des lichens, puis une succession d'espèces végétales s'établit. Les espèces pionnières de ces milieux sont des espèces fortement tolérantes aux faibles ressources et même parfois aux composés toxiques issus de l'érosion de la lave (Kirman 2003). Avec le temps, l'accumulation de litière va permettre la disponibilité de nutriments nécessaire aux autres espèces moins tolérantes au stress. Il existe durant les successions primaires des phénomènes dits de facilitation qui se traduisent par l'installation d'espèces sous l'effet positif sur le milieu d'espèces déjà présentes sur le site. Certaines espèces disparaissent au cours du temps, d'autres apparaissent et certaines persistent du début jusqu'à des stades très avancés.

La colonisation des coulées de lave qui fragmentent fréquemment le milieu forme un gradient de succession primaire et les populations se structurent en âge. Ce genre de situation constitue un site exceptionnel pour l'étude du fonctionnement des populations et des communautés. En particulier, pour l'étude des variations des traits biologiques et de l'impact des cycles d'extinction-colonisation sur la structure génétique des espèces. Plusieurs volcans actifs dans le monde pourraient permettre ce genre d'étude, et quelques uns font déjà l'objet d'un intense intérêt de la part des biologistes, c'est le cas du Mont St Helens aux Etats-Unis (Wood & Del Moral 1987), du Krakatau en Indonésie (Whittaker *et al.* 1989) ou encore du Piton de La Fournaise à La Réunion (Strasberg 1994, Thébaud & Strasberg 1997).

### *L'archipel des Mascareignes et l'île de La Réunion*

L'archipel des Mascareignes (Encadré i.2) est situé au cœur de l'Océan indien, il se compose de trois îles : l'île de La Réunion, l'île Maurice et l'île Rodrigue, à respectivement 800 km, 1000 km et 1400 km à l'est de Madagascar. Contrairement à l'île Rodrigue dont l'origine géologique soulève encore beaucoup de controverses et



dont l'âge pourrait remonter à plus de 8 millions d'années, la Réunion et l'île Maurice sont issues d'un même point chaud (Mac Dougal & Chauman 1969). L'île de La Réunion, dont le volcan originel Le Piton des Neiges, est actuellement éteint, est la plus grande des trois îles de l'archipel avec une surface d'un peu plus de 2500 km<sup>2</sup>. L'âge de La Réunion est estimé à environ 3 millions d'années contre 8 millions d'années pour l'île Maurice (Mac Dougal & Chauman 1969). Alors que l'activité volcanique s'est arrêtée il y a environ 25000 ans sur l'île Maurice, le Piton de la Fournaise (2569 m) au sud de La Réunion est actuellement un des volcans les plus actifs de la planète. Il émet régulièrement des coulées de lave sur le flanc sud-est de l'île, au niveau de la caldeira du Grand Brûlé (Fig. i.1).

Dans cette région, les pentes du Piton de la Fournaise sont en perpétuel remaniement à cause de l'intense activité volcanique, ainsi l'habitat de la forêt tropicale humide de basse altitude est régulièrement détruit et fragmenté. Excepté quelques hectares hors enclos mis en réserve, la forêt tropicale humide de basse altitude ne subsiste que dans cette zone où la fréquence des perturbations est grande. Le flux de lave régulier conduit les espèces à coloniser les sites laissés vacants pour survivre. Les fragments épargnés par les laves (momentanément) constituent les populations source à la colonisation (Thébaud & Strasberg 1997). La colonisation des coulées de lave forme un gradient de succession primaire. Strasberg (1994) montre la composition des différentes étapes de la succession. Après l'arrivée des lichens, les mousses et les fougères peuvent s'installer puis arrivent les premiers ligneux, d'abord les ligneux anémochores, puis rapidement les ligneux ornithochores. Les cycles d'extinction-colonisation dans cette zone suggèrent fortement que l'enclos du Grand Brûlé fonctionne en métapopulation. L'histoire des événements d'extinction-colonisation est connue et le substrat des coulées est chimiquement homogène (Bachelery 1981). Pour toutes les caractéristiques que nous venons d'énoncer, cette région de l'île constitue un excellent site pour l'étude de la dynamique des populations d'espèces colonisatrices évoluant en milieu fragmenté.

*Antirhea borbonica*: un modèle de choix

Le genre *Antirhea* appartenant à la famille des rubiacées comprend une trentaine d'espèces, la majorité étant représentée par des espèces d'arbres-arbustes souvent endémiques des régions où ils se trouvent. L'aire de répartition du genre comprend l'Amérique Centrale et l'Amérique du Sud, ainsi que l'Océanie. Dans l'océan indien, seules trois espèces sont présentes, *Antirhea madagascariensis* S.M. Chaw à Madagascar, *Antirhea bifurcata* (Desr.) Hook. à l'île Maurice et *Antirhea borbonica* Gmel endémique de l'île de La Réunion et de Maurice. *A. borbonica*, (Fig. i.2a) est un arbre qui peut atteindre plus de 15 mètres de hauteur et peut vivre certainement plus de 150-200 ans. C'est un des ligneux les plus abondants de la forêt tropicale humide de basse et moyenne altitude à La Réunion (Strasberg 1994, 1996), il est aussi présent à des altitudes plus importantes, dans les forêts de montagne ou encore dans les forêts d'altitude semi sèches de la côte ouest. Une des caractéristiques majeures de cette espèce est qu'en dehors du fait qu'on la trouve dans de très vieilles forêts (Strasberg 1996), c'est une des premières espèces ligneuses ornithochores à occuper les milieux ouverts (Strasberg 1994). En effet, *A. borbonica* est pionnier des coulées de lave et persiste sur tous les stades de la succession.

Dans la flore des Mascareignes (Verdcourt *et al* 1989), *A. borbonica* a été décrite comme une espèce dioïque. Néanmoins, ses fleurs (Fig. i.2bc) ont une morphologie hermaphrodite. Alors que les femelles ne présentent pas de pollen, des observations préliminaires montrent que certains individus définis comme mâles (anthères visibles à la gorge de la corolle alors que chez les femelles c'est le stigmate qui est visible) ont la capacité de fructifier (Thompson, Pailler com. pers). En conséquence, nous allons dès à présent définir deux morphes : un morphe pollinifère et un morphe femelle. La période de floraison des individus se situe entre octobre et janvier selon les habitats et le cortège de pollinisateurs est constitué d'insectes généralistes (syrphes, papillons de nuit...<sup>(pailler com pers)</sup>). Les fruits (Fig. i.2de) qui apparaissent entre fin novembre et mars, en fonction du type d'habitat considéré, sont de petites drupes charnues, rouge-noires à maturité, contenant généralement deux graines soudées. Des

observations ponctuelles indiquent qu'ils sont dispersés principalement par des oiseaux indigènes du genre *Zosterops*. (aller voir plus)

### *Objectifs et plan de la thèse*

*Antirhea borbonica* est un arbre pionnier des coulées de lave et cette espèce longévive persiste le long du gradient successional. Ce ligneux évolue dans des environnements différant par leurs conditions écologiques et leur régime de perturbation. On le trouve aussi bien dans des milieux perturbés et fragmentés par les coulées de lave que dans des milieux relativement plus stables, correspondant à de très vieux stades successionnels à l'abri de l'activité volcanique.

Les caractères ligneux, pionnier et longévive de cette espèce, en font un excellent candidat à la variation des traits biologiques le long de successions primaires. Nous allons au cours de cette étude procéder à une étude comparative de populations évoluant dans un environnement perturbé (l'enclos du volcan) et dans un environnement plus stable (vieux stades successionnels situés hors enclos) (Fig.i.3 et i.4cd).

### **Nos objectifs sont les suivants :**

**Premièrement**, nous allons définir s'il existe des variations des traits biologiques chez *A. borbonica* le long de la succession. D'une part, bien que cette espèce ait été qualifiée de dioïque, il semble que les morphes pollinifères aient la possibilité de fructifier. Nous allons quantifier cette capacité de fructification dans différents stades successionnels (Encadré i.3 et Tab.i.1). Existe-t-il une variation du genre sexuel en fonction du stade successional chez cette espèce ? Si oui, quelles en sont les causes ? Nous essaierons de déterminer par des manipulations de ressources *in situ*, si cette variation est sous l'influence directe des ressources. D'autre part, nous nous intéresserons à la masse des graines. Est ce que la masse des graines des individus

dans les vieux stades est supérieure à celle observée chez les individus des stades plus jeunes ? Ces investigations feront l'objet du CHAPITRE I : VARIATION DES TRAITS LIES A LA REPRODUCTION.

Deuxièmement, en considérant les variations du milieu et le devenir des plantules, nous allons nous intéresser à l'évolution du système de reproduction des espèces subdioïques. A partir des 3 hypothèses suivantes :

- (i) la capacité de fructification des individus augmente avec les ressources,
- (ii) plus la production de fruits augmente plus la compétition entre plantules est forte,
- (iii) les graines issues de morphes pollinifères sont sujettes à de la dépression de consanguinité,

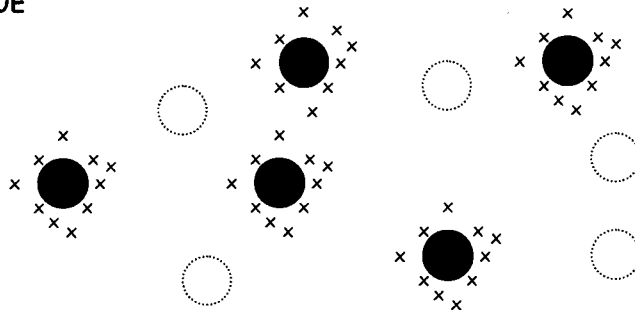
nous établirons un modèle afin de prédire les fréquences des morphes dans une population. Cette partie se composera d'un modèle phénotypique et d'observations *in situ*, détaillés dans le CHAPITRE II : EVOLUTION DU SYSTEME DE REPRODUCTION : ROLE DE LA COMPETITION.

Troisièmement, nous déterminerons les effets de la dynamique de colonisation sur la structure génétique d'*A. borbonica* dans une succession primaire où les processus écologiques ont une importance certaine pour la colonisation. Nous procéderons à l'étude de la diversité génétique en tenant compte de la structuration en âge des populations (Encadré i.3 et Tab.i.1). Observe-t-on des effets de fondation ? La différenciation entre jeunes populations est-elle plus grande qu'entre populations plus âgées ? Pour ce faire, nous avons identifié des locus microsatellites et AFLP et avons procédé à l'analyse de ces données moléculaires dans LE CHAPITRE III : STRUCTURATION GENETIQUE DANS UNE SUCCESSION PRIMAIRE.

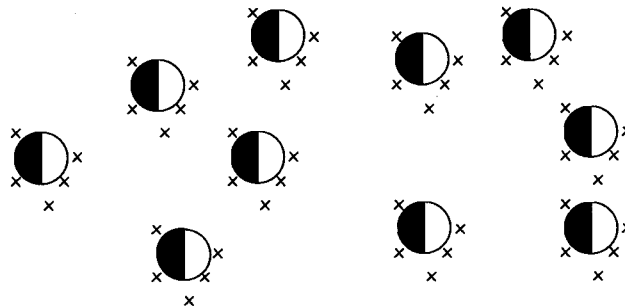
### Encadré i.1 : Schématisation du "seed shadow handicap" des espèces dioïques

Chez les espèces dioïques, seul un type d'individu produit des fruits, les femelles, et la production de graines par les femelles est souvent doublée comparativement aux individus des espèces hermaphrodites. Dans le schéma ci-dessous, il est clair de constater la nucléation plus importante des descendants des espèces dioïques par rapport aux espèces hermaphrodites pour un même nombre de descendants produits et dispersés à faible distance. Les males sont matérialisés par des cercles en pointillés, les femelles et les hermaphrodites par des cercles en ligne pleine. Les zones noires sont proportionnelles à la quantité de graines produites entre femelles et hermaphrodites et les croix représentent les descendants au sol.

#### ESPECE DIOÏQUE



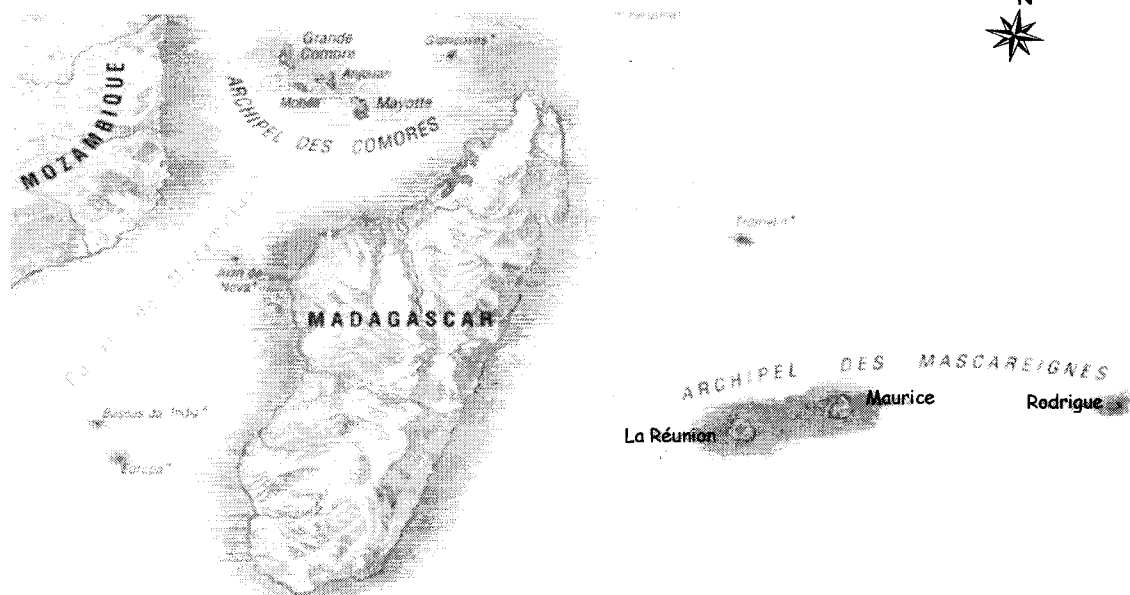
#### ESPECE HERMAPHRODITE



A partir du constat que dans la nature les espèces dioïques ne représentent qu'environ 6% des angiospermes (Renner & Ricklefs 1995) la majorité des espèces étant hermaphrodites, Heilbut (2000) émet l'hypothèse que ce faible taux de dioécie serait dû à une extinction plus fréquente des espèces dioïques et/ou une spéciation moins courante. Compte tenu de, (i) la proportion des individus portants des fruits chez les espèces dioïques, (ii) de la plus grande production de graines des femelles des espèces dioïques face aux individus des espèces hermaphrodites et (iii) de l'observation courante que la dispersion se fait le plus souvent sur de courtes distances des pieds maternels, entraînant la majorité des descendants sous ou à proximité de la canopée de la mère et donc à proximité les uns des autres, les espèces dioïques pourraient être défavorisées dans la colonisation et l'expansion des populations face aux espèces hermaphrodites.

*hauyia*

### Encadré i.2 : L' archipel des Mascareignes



L'archipel des Mascareignes est composé de trois île : La Réunion, l'île Maurice et Rodrigue. La Réunion est sous l'influence d'un climat tropical humide, tempéré avec l'altitude. La saisonnalité est plutôt marquée avec une saison fraîche et sèche (T. moy.= 21°C) de mai à novembre et une saison chaude et humide (T. moy. = 27°C) de décembre à avril. Durant la saison chaude il n'est pas rare que des phénomènes cycloniques concernent l'île. La pluviométrie de l'île est importante mais comporte des différences marquées engendrées par le relief (point culminant : 3069 m). On observe les minima (moins de 500 mm / an) sur la côte Ouest dite "côte sous le vent" et les maxima pouvant atteindre 10 m / an, au niveau de la côte Est dite "côte au vent".

### Encadré i.3 : Populations étudiées au cours de cette étude

Toutes les populations détaillées dans cet encadré ne feront pas forcément l'objet de chacun des protocoles mais les populations analysées au sein de chaque chapitre seront nommées au début de celui-ci. Nous avons échantillonné 13 populations sur l'île de La Réunion (Fig. i.3) et 1 population sur l'île Maurice. Les caractéristiques (âge du site, stade successional, début floraison, début fructification) sont répertoriées dans le tableau i.1.

#### A La Réunion,

##### Echantillonnage de 10 populations dans la forêt tropicale humide :

- 9 populations (C76, C61, C43a, C43b, C43c, C31, C19, KP1, KP2) sont situées en basse altitude (< 300m) sur le flanc Sud Est de l'île, dans l'enclos du Grand Brûlé où les perturbations volcaniques sont fréquentes. Ces populations diffèrent par l'âge de leur stade successional compris entre 28 et plus de 200 ans (Tab. 1).
- 1 population (MAL) sur le flanc Sud Est aussi mais située hors de la caldeira du Grand Brûlé et en moyenne altitude ( $\approx$  300m). Cette population se trouve dans la forêt de Mare Longue (Fig. i.4) qui est une forêt mise en réserve par l'ONF, elle correspond à un vieux stade successional dont l'âge est d'environ 500 ans.

Echantillonnage de 3 populations correspondant à des très vieux stades successionalset situées sur l'ancien massif du Piton des Neiges (volcan originel de l'île) où il n'existe plus d'activité volcanique :

- 1 population (CIL) dans la forêt tropicale de haute altitude ( $\approx$  1200m) vieille de plus de 500 ans, située dans le cirque de Cilaos.
- 1 population (DOD) dans la forêt tropicale semi-sèche de haute altitude ( $\approx$  1200m), vieille aussi de plus de 500 ans et située à Cap Noir à Dos d'âne.
- 1 population (BEB) dans la forêt de montagne en haute altitude ( $\approx$  1200m), vieille de plus de 500 ans et située dans la forêt de Bébour (Fig. i.4).

#### A Maurice,

Echantillonnage d'une population dans le Sud-Ouest de l'île dans la réserve ( $\sim$ 7000 hectares) de la forêt de Pétrin-Black River. C'est un site correspondant à un très vieux stade successional, vieux de plus de 500 ans et situé à environ 600m d'altitude. La pluviométrie annuelle est importante ( $\sim$ 5000mm).



Figure i.1 : Vue d'ensemble de l'enclos du Grand Brûlé.



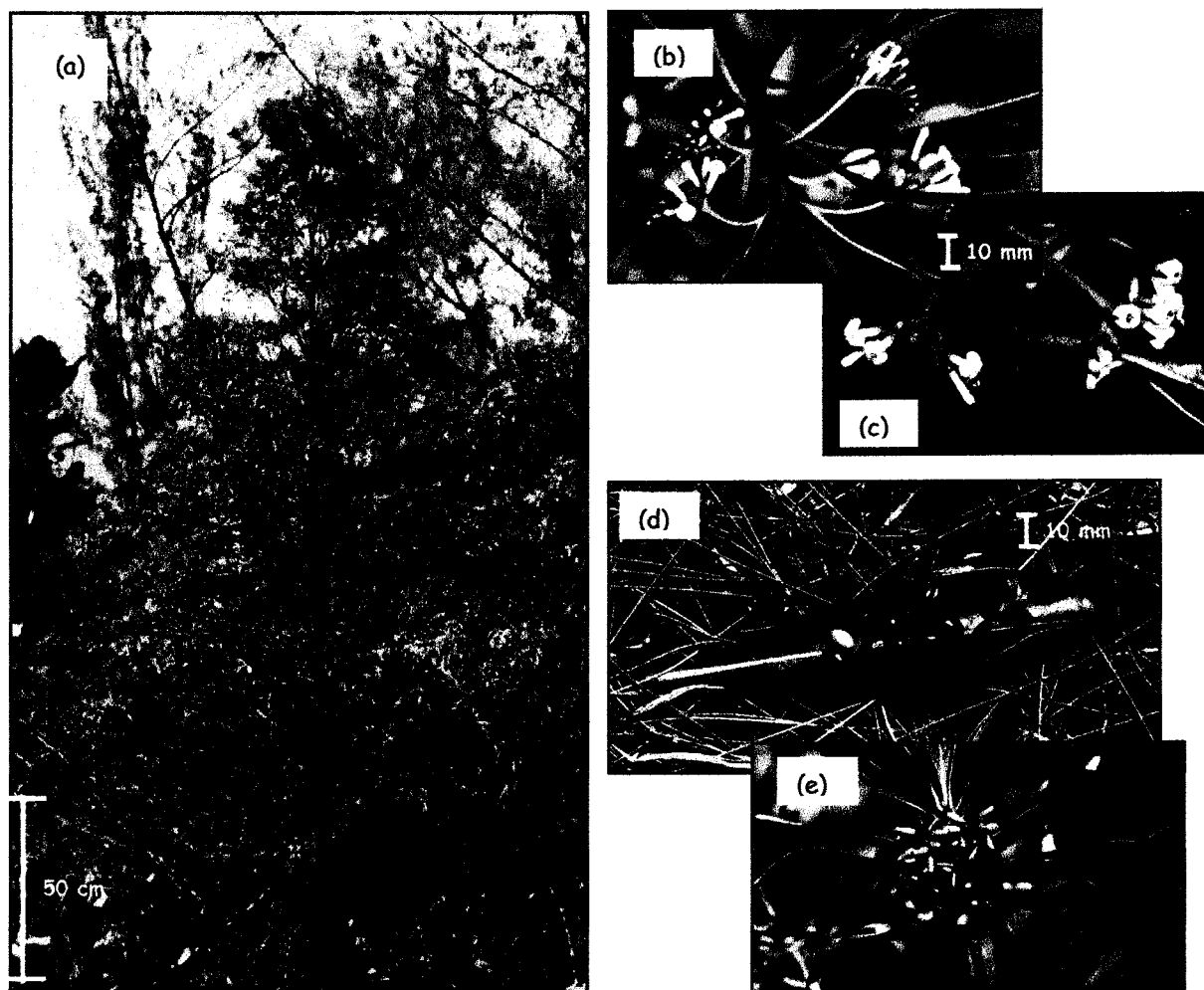
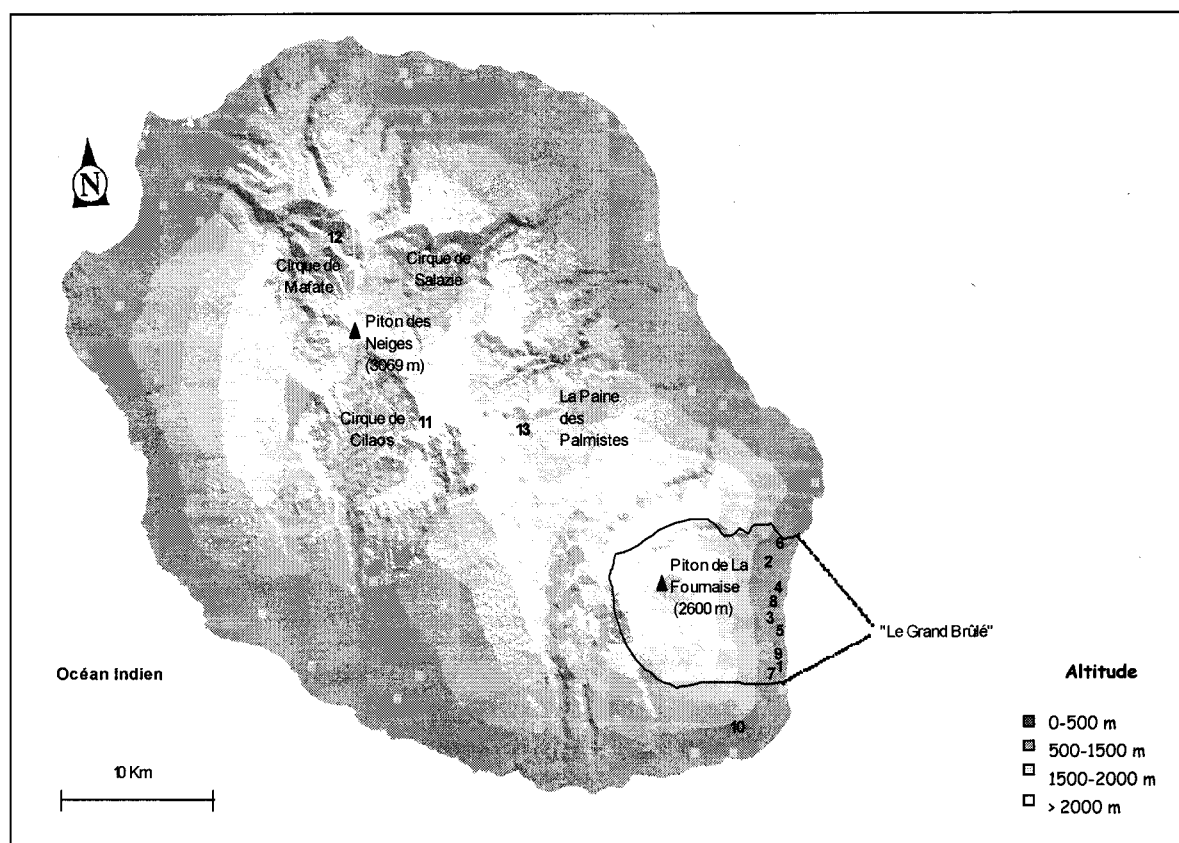


Figure 1.2 : (a) Individu d' *Antirhea borbonica* sur la coulée de 1943, (b) Fleurs du morphe pollinifère et (c) de femelle d' *Antirhea borbonica*, (d) Fruits et (e) infructescences d' *Antirhea borbonica*.



**Figure i.3 :** Localisation géographique des populations d' *Antirhea borbonica* échantillonnées sur l'île de La Réunion. 1 : C76, 2 : C61, 3 : C43a, 4 : C43b, 5 : C43c, 6 : C31, 7 : C19, 8 : KP1, 9 : KP2, 10 : MAL, 11 : CIL, 12 : DOD, 13 : BEB.

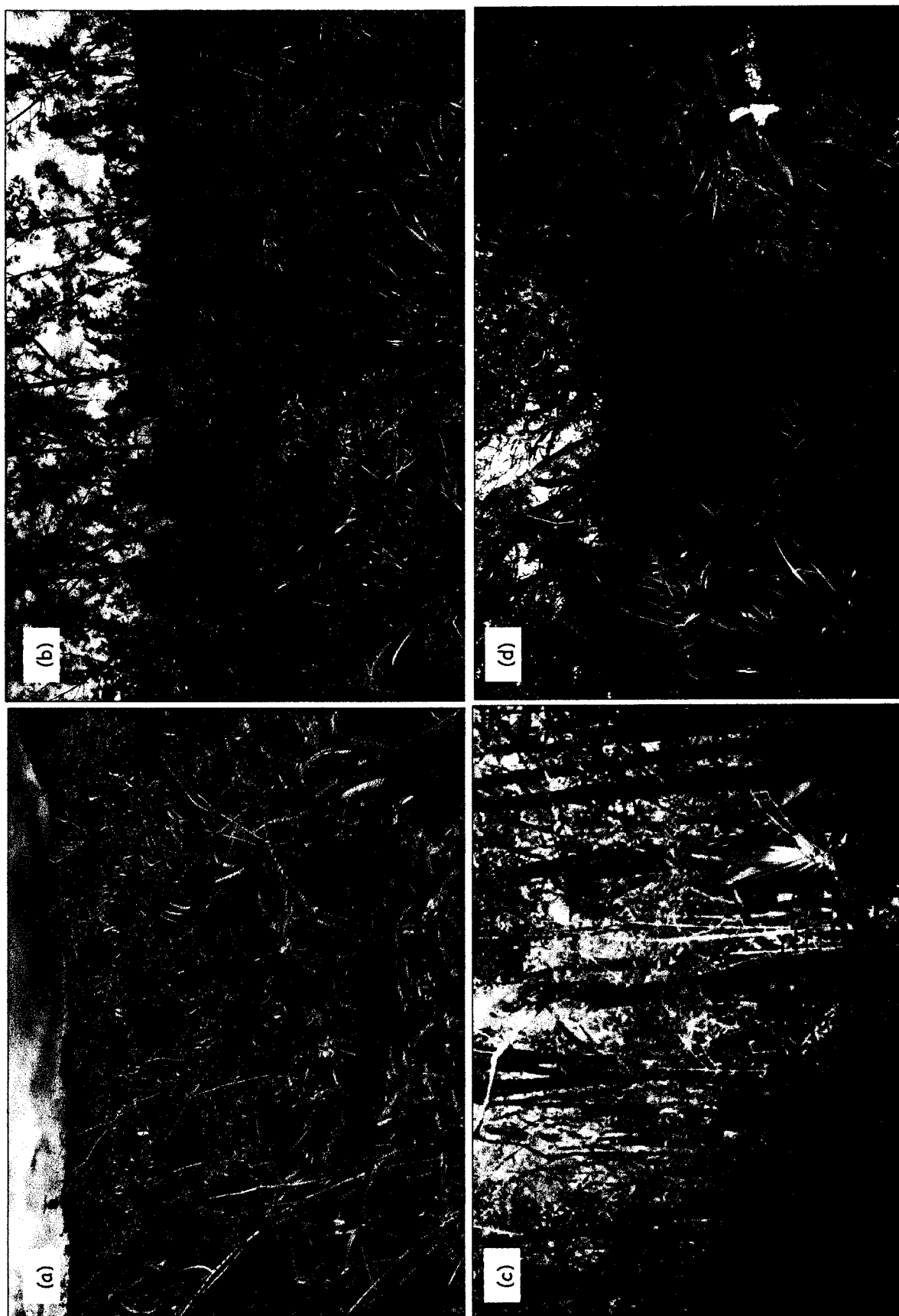


Figure 1.4 : (a) Coulée de lave de 1976, (b) Coulée de lave de 1943, (c) Forêt de Mare Longue et (d) Forêt de Bébour.

**Tableau i.1 : Caractéristiques des 14 populations d' *Antirhea borbonica* échantillonnées durant cette étude.**

*Remarque pratique : il est conseillé de bien mémoriser la page sur laquelle se trouve ce tableau car tout au long de cette thèse il sera nécessaire de faire la correspondance entre le nom de la population et son statut successional.*

| Population | Date de la<br>coulée | Stade successional                                                                            | Début<br>Floraison | Début<br>Fructification |
|------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| C76        | 1976                 | Très jeune stade, aucun individu reproducteur                                                 | -                  | -                       |
| C61        | 1961                 | Jeune stade, très jeune population avec peu<br>d'individus reproducteurs                      | Octobre            | Décembre                |
| C43a       | 1943                 | Jeune stade, jeune population avec beaucoup<br>d'individus reproducteurs                      | Octobre            | Décembre                |
| C43b       | 1943                 | Jeune stade, jeune population avec beaucoup<br>d'individus reproducteurs                      | Octobre            | Décembre                |
| C43c       | 1943                 | Jeune stade, jeune population avec beaucoup<br>d'individus reproducteurs                      | Octobre            | Décembre                |
| C31        | 1931                 | Jeune stade, jeune population avec beaucoup<br>d'individus reproducteurs                      | Octobre            | Décembre                |
| C19        | 1900                 | Stade d'âge intermédiaire, population avec beaucoup<br>d'individus reproducteurs              | Octobre            | Décembre                |
| KP1        | 200-300 ans          | Fragment de forêt épargné par les laves population<br>avec beaucoup d'individus reproducteurs | Octobre            | Décembre                |
| KP2        | 200-300 ans          | Fragment de forêt épargné par les laves population<br>avec beaucoup d'individus reproducteurs | Octobre            | Décembre                |
| MAL        | ~ 500 ans            | Vieux stade, forêt climacique en réserve                                                      | Novembre           | Janvier                 |
| DOD        | > 500 ans            | Vieux stade, ancien massif (Piton des Neiges):                                                | Janvier            | Mars                    |
| CIL        | > 500 ans            | Vieux stade, ancien massif (Piton des Neiges):                                                | Janvier            | Mars                    |
| BEB        | > 500 ans            | Vieux stade, ancien massif (Piton des Neiges):                                                | Janvier            | Mars                    |
| MAU        | > 500 ans            | Très vieux stade, plus aucune activité volcanique                                             | Décembre           | Janvier                 |

# **CHAPITRE I :**

## **VARIATION DES TRAITS LIES**

### **A LA REPRODUCTION**

## I- INTRODUCTION

Chez les plantes, un grand nombre d'études ont reporté des variations du genre sexuel, à la fois intra génériques (Delph 1990, Weller *et al.* 1990, Humeau *et al.* 1999) et intra spécifiques (Barrett 1992, Wolfe & Shmida 1997, Ashman 1999, Humeau *et al.* 2000, Case & Barrett 2004). Dans ces études, les variations suivent un patron général selon lequel, une spécialisation du genre sexuel arrive dans les sites limités en ressources. Ceci indique que les ressources pourraient être un facteur important dans l'expression du genre sexuel comme le mentionnent certains auteurs (Charnov 1982, Diggle 1993, Charlesworth 1999). Mais peu d'études à ce jour ont démontré l'effet direct des ressources sur la variation du genre sexuel apparent en populations naturelles.

Dans ce chapitre nous allons déterminer s'il existe des variations des traits liés à la reproduction chez *A. borbonica*, notamment concernant le genre sexuel des individus. Si une telle variation existe, alors nous essayerons d'en comprendre la cause. *Antirhea borbonica* a été décrit comme une espèce dioïque mais les fleurs sont morphologiquement hermaphrodites du fait de la présence simultanée d'anthères et de style. De plus, le morphe pollinifère semble capable de fructifier. Il est intéressant de définir si cette capacité du morphe pollinifère à produire des fruits varie en fonction du stade successional.

Dans un premier temps, nous proposons de définir la morphologie des fleurs des individus d'*A. borbonica* et de voir s'il existe un dimorphisme sexuel de la taille des fleurs chez cette espèce comme cela est souvent observé chez les espèces dioïques et gynodioïques (Delph *et al.* 1996). Puis, nous quantifierons la variation de l'expression de la dioécie en fonction du stade successional. A partir de la littérature, nous pouvons attendre deux possibilités pour le patron de variation du genre sexuel. Soit, sous la pression de l'assurance à la reproduction et du "*seed shadow handicap*", les jeunes stades successionnels nouvellement colonisés favorisent la présence de morphes pollinifères capables de fructifier. Soit, compte tenu de la faible disponibilité en ressources des jeunes stades d'une succession primaire comparativement aux

stades tardifs, l'espèce est plutôt dioïque stricte sur les jeunes stades colonisés et sub-dioïque sur les vieux stades.

Dans ce contexte, nous déterminerons la fécondité (proportion d'individus portant au moins un fruit, ratio du nombre de fruits / nombre de fleurs) des deux morphes d'*A. borbonica*. De plus, nous effectuerons une expérimentation en conditions contrôlées dans le but de vérifier si les graines issues du morphe pollinifère ont une valeur sélective inférieure à celles des femelles comme cela est le cas dans la majorité des espèces gyno ou sub-dioïques.

Enfin, nous proposons de tester expérimentalement l'effet des **ressources** sur les variations du système de reproduction en **populations naturelles**, ce qui constitue un **apport nouveau** dans le cadre du déterminisme du genre sexuel dans les populations naturelles.

Un point essentiel de cette étude réside dans la **répétition des mesures**. La majorité des observations et expérimentations a été faite sur **plusieurs années** (3-4 ans) afin de quantifier de façon fine les patrons de variations entre morphes et populations.

## II- EXPERIMENTATIONS

La totalité des protocoles de ce chapitre figure dans l'article "Gender variation and primary succession in a tropical pioneer woody species, *Antirhea borbonica* " soumis à Journal of Ecology (annexe 2). Toutes les analyses statistiques ont été faites avec SAS (2001). Les ANOVAS ont été conduites en utilisant la procédure PROC GLM pour les données quantitatives et la procédure PROC GENMOD pour les données binaires. Les comparaisons par paires ont été faites à l'aide de l'instruction LSMEAN. Les données ont été transformées en  $\log(x+1)$  ou racine carrée ( $x$ ) afin de satisfaire les conditions de normalité des résidus et d'homoscédasticité.

Les populations échantillonnées dans les différentes expérimentations et les années d'échantillonnage sont résumées dans le tableau I.1. Dans chacune des

populations, des mesures végétatives ont été faites sur des individus en fleurs (Encadré I.1).

### 1 Morphologie florale

Afin de définir l'existence d'un dimorphisme sexuel de la taille des fleurs chez *A. borbonica*, nous avons mesuré les traits floraux suivants (Encadré I.2) : longueur de la corolle, longueur du style, hauteur des anthères, chez des femelles et des morphes pollinifères dans 6 populations réunionnaises (3 dans le Grand Brûlé et 3 en dehors) ainsi que dans une population de Maurice (Tab. I.1). Puis sur des femelles et des morphes pollinifères des populations de C43b et MAL, nous avons compté le nombre de grains de pollen et d'ovules par fleur et déterminé la proportion de stigmates ouverts au sein des individus des deux morphes (Encadré I.2).

### 2- Sexe-ratio

En 2004 et en 2003, sur respectivement 12 et 9 populations (Tab. I.1), différant par leur stade successional et leur localisation géographique, nous avons établi des valeurs de sexe-ratio. Afin de tester l'hétérogénéité des sex-ratios entre les populations intra-année et l'écart à la proportion 1:1 au sein de chaque population chaque année, nous avons procédé à des tests de  $G^2$  d'hétérogénéité et de conformité respectivement.

### 3- Fécondité, masse des graines et germination

Pour déterminer s'il existe des différences dans la fonction reproductive entre morphes mais aussi entre populations, dans 12 populations échantillonnées en 2004 et 6 populations de 2001 à 2003 (Tab. I.1), nous avons mesuré sur des femelles et des morphes pollinifères les variables suivantes : nombre d'inflorescences par nœud, nombre de fleurs et nombre de fruits par inflorescence (Encadré I.3). Pour chaque individu, le diamètre du tronc, la hauteur, la largeur et le nombre de branches de l'arbre sont connus et nous avons déterminé une mesure végétative (diamètre X hauteur X largeur X nb branches)/4 que nous incluons en covariable dans certaines



analyses. Toujours en 2004 mais dans 9 populations (Tab. I.1), 3 jeunes et 2 vieux stades dans l'enclos, 3 vieux stades hors enclos et 1 population de l'île Maurice, nous avons mesuré la masse des graines produites par les femelles (Encadré I.3). Seuls les morphes pollinifères de la population de MAL ont produit des graines arrivées à maturité en effectif convenable pour la récolte.

En vue de quantifier la capacité germinative des graines issues des femelles des populations de C43b, KP1 et MAL et des morphes pollinifères de la population de MAL, nous avons mis à germer (Encadré I.3) des graines en milieu contrôlé. Cette expérience de germination a eu lieu dans une serre du CEFÉ-CNRS de Montpellier et a été répétée, sans graines issues de morphe pollinifère, dans une serre du Pôle de Protection des Plantes à La Réunion. Nous avons suivi le taux de germination, de mortalité et la hauteur des plantules pendant près d'un an.

#### 4- Effet des ressources sur les fonctions reproductives des individus

Dans le but de tester l'effet des ressources en populations naturelles, nous avons échantillonné des femelles et des morphes pollinifères sur une coulée récemment colonisée qui constitue un stade stressant (C43b) et sur un stade successional plus ancien où la population (MAL) est installée depuis beaucoup plus longtemps. Nous avons établi 3 groupes d'individus composés de femelles et morphes pollinifères que nous avons suivi chaque mois pendant 3 saisons de floraison-fructification sur C43b et 2 saisons sur MAL. Les trois groupes d'individus ont subi des traitements différents : un groupe d'individus témoins, un groupe d'individus supplémentés en phosphore, azote et potassium, et un groupe d'individus défoliés (Encadré I.4). Sur chacun des individus, nous avons estimé le nombre d'inflorescences par noeud, le nombre de fleurs et de fruits par inflorescence et défini la proportion d'inflorescence portant des fruits. Nous avons aussi suivi la croissance végétative, nombre de nœuds par branche sur les individus de la population C43b.

### III- RESULTATS

#### 1- Morphologie florale, inflorescence par nœud et nombre de fleurs

Quelque soit la population considérée, un net dimorphisme floral est visible chez *Antirhea borbonica* (Fig. I.1). La longueur de la corolle est plus élevée chez le morphe pollinifère que chez la femelle ( $F_{1, 287} = 1650, P < 0.001$ ). Les organes reproducteurs mâles et femelles sont présents chez les deux morphes. Mais le morphe pollinifère porte les anthères plus haut que les femelles ( $F_{1, 287} = 1864, P < 0.001$ ) et les anthères sont visibles contrairement à celles des femelles. A l'inverse, la longueur du style est supérieure chez les femelles ( $F_{1, 287} = 310, P < 0.001$ ), et c'est le stigmate qui est à la gorge de la corolle chez ces dernières.

Dans les deux populations étudiées (Tab.I.2), alors que le nombre d'ovules par fleur chez le morphe pollinifère est équivalent à ce que l'on trouve chez les femelles et que le pourcentage de stigmates ouverts n'est pas différent entre les deux morphes, le nombre moyen de grains de pollen par fleur est quasi nul chez les femelles et donc nettement inférieur à celui des morphes pollinifères ( $F_{1, 37} = 577.92, P < 0.001$ ). Par ailleurs, concernant le nombre d'ovules par fleur, il existe des différences entre la population de MAL et celle de C43b, les individus de MAL montrent un plus grand nombre d'ovules par fleur que les individus de C43b quelque soit le morphe ( $F_{1, 36} = 4.23, P < 0.05$ ) (Tab. I.2).

Lorsque l'on s'intéresse au nombre d'inflorescences par nœud durant l'année 2004, on note un effet population significatif ( $F_{11, 335} = 4.94, P < 0.001$ ), un effet sexe significatif ( $F_{1, 335} = 4.23, P < 0.05$ ) mais pas d'interaction. La co-variable "mesure végétative" est significative ( $F_{1, 335} = 15.21, P < 0.001$ ). Mais aussi bien, sur les 12 populations échantillonnées en 2004 que sur les populations suivies sur 3 ou 4 ans, aucune tendance dans la variation du nombre d'inflorescences par nœud ne peut être établi. Par contre, l'analyse du nombre de fleurs par inflorescence en 2004 (Fig. I.2) montre un effet population significatif ( $F_{11, 322} = 80.35, P < 0.001$ ) du au faible nombre de fleurs par inflorescence dans les très vieilles populations hors du Grand Brûlé (DOD, CIL, BEB) et un effet sexe significatif ( $F_{1, 322} = 26.19; P < 0.001$ ) avec le nombre

de fleurs par inflorescence du morphe pollinifère généralement supérieur à celui des femelles. L'interaction sexe\*population n'est pas significative. Le suivi des 6 populations, C43b C19, KP1, MAL, DOD et BEB conforte ces résultats (Fig. I.3).

## 2- Sexe-ratio

En 2003 et en 2004, il n'existe pas d'hétérogénéité du sexe-ratio (Tab. I.3) entre les populations. Lorsque l'on procède aux tests de conformité, en 2004, seule la population de BEB montre un sexe-ratio biaisé en faveur des morphes pollinifères. En 2003, deux populations, BEB et KP1, montrent un sexe-ratio biaisé en faveur des morphes pollinifères (Tab. I.3). Par ailleurs, aucune corrélation n'existe entre la fréquence des femelles et le ratio du fruitset\* morphe pollinifère / fruitset femelle (régression sous SAS,  $F=0.05$ , ddl=1, erreur=10,  $P > 0.5$ ).

**Tableau I.3 :** Nombre d'individus sexés et fréquences des morphes pollinifères dans 12 populations en 2004 et 9 populations en 2003 d'*Antirhea borbonica* à La Réunion. Le sexe-ratio défini comme le nombre de morphes pollinifères / nombre de morphes femelles est testé avec un test de  $G^2$ . La significativité du test (valeur de sexe-ratio différente statistiquement de 1 : 1) est mentionnée par une astérisque \*.

| Populations | 2003           |                                |     |       | 2004           |                                |     |       |
|-------------|----------------|--------------------------------|-----|-------|----------------|--------------------------------|-----|-------|
|             | Effectif total | Fréquence morphes pollinifères | ddl | $G^2$ | Effectif total | Fréquence morphes pollinifères | ddl | $G^2$ |
| C61         | -              | -                              | -   | -     | 16             | 56.3                           | 1   | 0.25  |
| C43a        | 78             | 46.2                           | 1   | 0.46  | 80             | 47.5                           | 1   | 0.20  |
| C43b        | 67             | 49.3                           | 1   | 0.01  | 81             | 51.9                           | 1   | 0.11  |
| C43c        | 82             | 54.2                           | 1   | 0.2   | 74             | 54.1                           | 1   | 0.49  |
| C31         | -              | -                              | -   | -     | 61             | 54.1                           | 1   | 0.41  |
| C19         | 108            | 56.5                           | 1   | 1.82  | 96             | 57.3                           | 1   | 2.05  |
| KP1         | 85             | 61.2                           | 1   | 4.28* | 81             | 56.8                           | 1   | 1.50  |
| KP2         | -              | -                              | -   | -     | 78             | 52.6                           | 1   | 0.21  |
| MAL         | 100            | 51                             | 1   | 0.04  | 95             | 50.5                           | 1   | 0.01  |
| CTL         | 76             | 57.9                           | 1   | 1.90  | 71             | 49.3                           | 1   | 0.01  |
| DOD         | 73             | 54.8                           | 1   | 0.67  | 75             | 54.7                           | 1   | 0.65  |
| BEB         | 91             | 61.5                           | 1   | 4.89* | 87             | 62.1                           | 1   | 5.12* |

\* Le fruitset est défini par le ratio : nombre de fruits / nombre de fleurs.

### 3- Fécondité, masse de graine et germination

#### Fécondité

En 2004, l'étude de 12 populations réunionnaises montre que contrairement à la totalité des femelles qui fructifie, la capacité des morphes pollinifères à fructifier est variable selon la population examinée ( $df=11$ ;  $\chi^2=78.08$  ;  $P < 0.001$ ). Cette variation est fonction du stade successional considéré. En effet, sur les jeunes stades moins de 20% des morphes pollinifères portent des fruits contre 50% environ dans les stades plus tardifs allant même jusqu'à 100 % dans la population de MAL (Fig. I.4.). Le suivi sur plusieurs années des mêmes individus dans les populations C43b, C19, KP1, MAL, DOD, BEB montre que cette tendance est retrouvée chaque année (Fig. I.5). Mais la proportion de morphes pollinifères portant au moins un fruit sur les 3 ou 4 ans confondus dans les jeunes stades, est quasi-équivalente à la proportion observée dans les stades plus âgés (Fig. I.6). Ainsi, la majorité des plantes du morphe pollinifère est capable de fructifier au moins une fois en 4 ans quelque soit le site. Mais sur les jeunes sites, la production de fruits n'a pas lieu chaque année pour un individu donné.

En ce qui concerne le ratio nombre de fruits / nombre de fleurs en 2004 (Fig. I.7), l'interaction sexe\*population est significative ( $df=11$ ;  $\chi^2=2913.04$ ;  $P < 0.001$ ), due à une augmentation de ce ratio dans les vieilles populations. Dans toutes les populations le ratio nb fruits / nb fleurs du morphe pollinifère est inférieur à celui des femelles ( $df=1$ ;  $\chi^2=12207.7$ ;  $P < 0.001$ ), mais il augmente dans les stades tardifs de la succession ( $df=11$ ;  $\chi^2=3091.68$ ;  $P < 0.001$ ). Les résultats sont similaires chaque année sur les populations suivies pendant 3 ou 4 ans (Fig. I.8).

#### Masse des graines

Après avoir mis en évidence une forte corrélation entre les différentes mesures de graines (longueur - largeur - masse), nous avons mis en évidence un effet population significatif sur la masse des graines chez les femelles chaque année (2004:  $F_{8, 132} = 16.3$ ;  $P < 0.001$  - 2003 :  $F_{7, 100} = 35.5$ ;  $P < 0.001$  - 2002 :  $F_{6, 111} = 55.9$ ;  $P < 0.001$  et 2001 :  $F_{6, 107} = 35.1$ ;  $P < 0.001$ ). En 2004 comme sur les 3 autres années, la masse des

graines issues de femelles dans les premiers stades de la succession est moins importante que celle des graines issues de femelles de stades très anciens comme BEB et l'île Maurice (MAU) (Fig. I.9). Par ailleurs, dans la population de MAL, les graines issues du morphe pollinifères montrent une masse inférieure à celles des femelles en 2001 ( $F_{1, 33} = 10.7$ ;  $P < 0.01$ ), en 2003 ( $F_{1, 28} = 12.9$ ;  $P < 0.01$ ) et 2004 ( $F_{1, 25} = 3.8$ ;  $P < 0.05$ ) mais pas en 2002 ( $F_{1, 23} = 0.03$ ;  $P > 0.5$ ) (Fig. I.10).

### Germination

Concernant la germination des graines issues de femelles des populations de C43b, KP1 et MAL dans les deux essais (Montpellier et St Pierre de La Réunion), le taux de germination varie de façon significative entre ces populations (Montpellier :  $df=2$ ;  $\chi^2=22.8$ ;  $P < 0.001$  et St Pierre :  $df=2$ ;  $\chi^2=10.4$ ;  $P < 0.001$ ). Il est d'environ 65%, 80% et 90% dans les populations de C43b, KP1 et MAL respectivement. Dans les deux essais, les graines des femelles des populations de C43b et KP1 germent moins bien que celles des femelles de MAL. Il n'y a pas d'effet significatif de la co-variable masse de graine sur le pourcentage de germination et aucune corrélation entre n'a été mise en évidence entre la masse des graines par famille et le taux de germination dans les deux essais. Il n'existe pas de corrélation non plus entre la masse des graines par famille et le taux de mortalité des plantules, et la co-variable masse de graine n'a pas d'effet significatif sur la mortalité. Le taux de mortalité est d'environ 10% sur l'essai effectué à Montpellier et 25% à St Pierre, aucune différence n'a été observée entre les trois populations chez les femelles. De la même façon, aucun effet population n'est observé sur la taille des plantules.

Lorsque l'on compare le morphe pollinifère et les femelles de la population de MAL, on note un taux de germination des graines issues du morphe pollinifère (~50%) nettement inférieur ( $df=1$ ;  $\chi^2=31.9$ ;  $P < 0.001$ ) à celui des graines issues de femelles (~90%) et les plantules issues du morphe pollinifère meurent plus fréquemment (~30%) que celles issues des femelles (~5%) ( $df=1$   $\chi^2=12.2$  ;  $P < 0.001$ ). Il n'y a pas d'effet sexe sur la taille des plantules survivantes.

Il est important de noter que la fonction femelle des morphes pollinifères relativement à celle des femelles est d'environ 16% lorsque l'on tient compte de la proportion d'individus portant des fruits, du nombre d'inflorescences par nœud, du nombre de fleurs par inflorescence, du ratio nombre de fruits / nombre de fleurs, du taux de germination et de survie des plantules. Ceci démontre que la fonction femelle des femelles est environ 6 fois plus efficace que la fonction femelle des morphes pollinifères pour la population de MAL dans les conditions de nos expérimentations.

#### 4- Effet des ressources sur les fonctions reproductives des individus

##### Population de C43b

L'addition de ressources chez les individus de la population C43b entraîne une augmentation ( $F_{1, 36} = 14.2$ ;  $P < 0.001$ ) du nombre de nœuds par branche (Fig. I.11) dès la première saison de supplémentation et cela aussi bien chez les femelles que chez les morphes pollinifères. Durant la première saison, les valeurs des autres traits mesurés (Fig. I.12) ne diffèrent pas entre les individus témoins et supplémentés excepté pour le nombre d'inflorescence par nœud (Fig. I.12a). L'apport en ressource augmente le nombre d'inflorescences par nœud alors que la défoliation tend à le diminuer chez les deux morphes. L'interaction saison\*traitement est significative ( $F_{3, 88} = 3.27$ ;  $P < 0.05$ ) ainsi que l'effet traitement ( $F_{2, 54} = 16.39$ ;  $P < 0.001$ ).

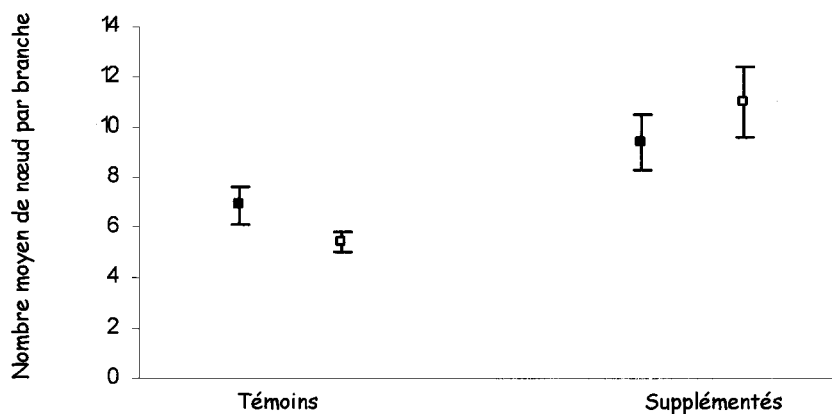


Fig. I.11 : Nombre de nœuds moyen par branche chez les morphes femelle (□) et pollinifère (■) témoins et supplémentés d' *Antirhea borbonica* de la population C43b durant la saison 1

La deuxième année nous avons pu constater un effet de l'apport en ressource sur la production de fruits. Le nombre de fleurs par inflorescence ( $F_{2, 54} = 5.19$ ;  $P < 0.01$ ) et la proportion de morphes pollinifères portant au moins un fruit ( $df=2$ ,  $\chi^2=9.03$  ;  $P < 0.05$ ) sont augmentés sous l'effet des ressources et diminués chez les individus défoliés (Fig. I.12b et I.12c), cela est particulièrement clair pour la dernière saison. De plus, on constate une interaction saison\*traitement\*sexe significative ( $df=5$ ,  $\chi^2=49.40$  ;  $P < 0.001$ ) du fait de l'augmentation du pourcentage d'inflorescences portant au moins un fruit (Fig. I.12d) chez les morphes pollinifères supplémentés lors de la saison 3. Enfin, l'effet traitement est significatif sur le ratio nombre de fruits / nombre de fleurs ( $df=2$ ,  $\chi^2=18.23$  ;  $P < 0.001$ ), les individus supplémentés ont un ratio nombre de fruits / nombre de fleurs supérieur à celui des témoins qui ont eux même un ratio supérieur aux individus défoliés durant les deux dernières saisons (Fig. I.12e).

Il est important de noter, que l'effet sexe est significatif quelque soit la saison et le traitement, pour le pourcentage d'inflorescence portant des fruits ( $df=1$ ,  $\chi^2=168.70$  ;  $P < 0.001$ ) et le ratio nombre de fruits / nombre de fleurs ( $df=1$ ,  $\chi^2=339.82$  ;  $P < 0.001$ ), avec des valeurs supérieures pour les femelles. Un autre résultat remarquable est la disparition dès la deuxième saison, de l'effet sexe sur la proportion d'individus portant des fruits, au sein des individus supplémentés. Enfin, lorsque l'on cumule les trois saisons de suivi, la proportion de morphes pollinifères portant au moins un fruit atteint 50% pour les individus défoliés, 80% pour les témoins et 100% pour les individus ayant reçu un apport en ressource.

### Population de MAL

Le fort effet des ressources sur la fonction femelle, notamment chez le morphe pollinifère, observé dans la population de C43b n'est pas retrouvé à MAL. Dans cette population, quelque soit le trait mesuré (Fig. I.13), aucun effet de la supplémentation en ressources n'a été relevé.

## VI- DISCUSSION

Plusieurs résultats clés apparaissent dans ce premier chapitre. Une variation du genre sexuel existe chez *A. borbonica* le long de la succession. Alors que les femelles d'*Antirhea borbonica* semblent strictement unisexuées, les morphes pollinifères montrent une variation de leur genre sexuel liée au stade successional considéré. Dans une année donnée, les morphes pollinifères des jeunes stades tendent vers l'unisexualité alors que sur les stades plus tardifs, un plus grand nombre de morphes pollinifères produisent des fruits. L'étude sur 4 ans et l'apport en ressources montrent que tous les individus pollinifères peuvent produire des fruits mais cette capacité de fructification est limitée dans les jeunes populations. Enfin, la masse des graines des femelles augmente sensiblement dans les vieux stades de succession.

Les mesures de la fonction femelle (production de fruits) des morphes pollinifères dans plusieurs populations, de stades successionnels différents, montrent une nette variation. Mais cette variation du genre sexuel ne va pas dans le sens d'une assurance à la reproduction ou de l'effet du "*seed shadow handicap*". Sur les jeunes stades le morphe pollinifère produit nettement moins de fruits comparativement aux morphes pollinifères des stades tardifs de la succession. L'assurance à la reproduction ne semble donc pas être un facteur induisant la sélection de l'hermaphrodisme chez *A. borbonica*. L'abondance de l'espèce (Strasberg 1994) dans cet habitat peut expliquer la faible pression que constitue l'assurance à la reproduction sur les coulées de lave. De même, les morphes pollinifères des jeunes stades colonisés ayant une capacité de fructification négligeable, la théorie du "*seed shadow handicap*" (Heibuth *et al.* 2001) n'est pas en adéquation avec les caractéristiques du morphe pollinifère d'*A. borbonica*.

Chez *Antirhea borbonica*, conformément aux observations de plusieurs études (Barrett 1992, Wolfe & Shmida 1997, Ashman 1999, Humeau *et al.* 2000, Case & Barrett 2004), en conditions stressantes, sur les très jeunes stades, les individus ont des fonctions sexuelles spécialisées, mais sur des stades plus tardifs de la succession, où le niveau de ressources est plus important, les morphes pollinifères présentent une



production de fruits, donc un genre phénotypique (Fig. I.14), supérieur. Cette capacité à produire des fruits plus tard dans la succession, pourrait être expliquée par des facteurs génétiques, développementaux (âge) et/ou environnementaux.

Bien que nous n'ayons pas testé de façon rigoureuse la composante génétique de cette variation, ce qui est relativement difficile sur des espèces ligneuses à très longue durée de vie et dont l'âge reproductif est tardif, l'ensemble de nos résultats suggère que la différenciation génétique ne constitue pas l'explication principale. En premier lieu, il apparaît que presque la totalité des individus pollinifères suivis durant plusieurs années sur les jeunes coulées, produisent des fruits au moins une année. En effet, les observations des individus de la jeune population de la coulée 1943, faites sur les quatre ans, mentionnent que 80% des morphes pollinifères ont été capables de faire des fruits pendant cette période. De plus, lorsque l'on fournit des ressources aux individus de la coulée de 1943, 100% des morphes pollinifères supplémentés en ressources sont capables de fructifier dès la deuxième saison de supplémentation. Ainsi, tout laisse à penser que les morphes pollinifères constituent "un seul type d'individu" capable de fournir des fruits dont la production est dépendante du niveau de ressources.

Même si l'on ne peut complètement écarter la composante génétique ou le paramètre "âge" pour expliquer (au moins en partie) la variation du genre sexuel, les résultats de notre expérimentation d'apport de ressources, suggèrent très fortement que le niveau de ressource joue un rôle prépondérant dans l'expression du genre sexuel chez le morphe pollinifère. Sur la coulée de 1943 il n'existe pas de sol et les ressources sont relativement faibles, un apport en ressource entraîne très nettement et rapidement une augmentation de la croissance végétative et de la fonction femelle chez les deux morphes sexuels. Cela démontre que les individus de la population de la coulée de 1943 évoluent en conditions limitantes. Ces conditions limitantes peuvent expliquer la moins bonne performance femelle des morphes pollinifères de cette population comparativement à ceux des populations plus âgées, pour lesquelles le niveau de ressources est plus important compte tenu de l'âge du stade successional. Cette explication est confortée par le fait que dans la population de MAL, qui est un vieux

stade successional avec une disponibilité en ressources certainement plus importante, l'apport en ressource n'a pas mis en évidence une augmentation de la fonction femelle des individus. Il est fort probable, que les individus d'*A. borbonica* présents sur ce vieux stade successional soient moins limités en ressources que ceux évoluant sur de très jeunes coulées où seule la lave brut n'ayant subi que peu d'érosion constitue le substrat. Néanmoins, même s'il est raisonnable de penser que les individus sur les vieux stades sont moins limités en ressources que sur les jeunes stades, il est peu plausible que les individus de MAL ne soient pas limités du tout en ressources. Mais la mise en évidence de cette limitation sur MAL, pourrait demander plus de saisons d'observation ou plus de ressources fournies en raison, de la grande taille des individus et de la présence de plus de végétation, donc de plus de compétition. Ceci étant, alors que beaucoup d'études constatent une variation du genre sexuel des individus pouvant être expliquée par le facteur ressources, nous avons mis en évidence l'influence directe de ce facteur sur la variation du genre sexuel des morphes pollinifères chez *A. borbonica* en populations naturelles. Cette expérimentation *in situ* dans une succession primaire constitue donc un apport original dans la compréhension de la labilité du genre sexuel.

Un second résultat appuyant l'hypothèse que la fécondité est limitée sur les jeunes coulées en raison de la faible disponibilité en ressources, est exprimé par la variation de la masse des graines des femelles qui augmente avec le stade successional. Bien que cette variation de masse des graines puisse être sous l'influence de l'âge ou de la taille des individus ou d'un compromis : nombre de graines produites-valeur sélective, elle peut aussi traduire une certaine plasticité, voire une différenciation adaptative si les grosses graines sont plus compétitives que les petites, ces dernières étant mieux dispersées. De telles variations pourraient donc refléter un compromis colonisation-compétition.

En dépit de la morphologie hermaphrodite des fleurs d'*A. borbonica* et de la capacité du morphe pollinifère à fructifier, il est difficile de définir cette espèce comme gynodioïque. En effet, *A. borbonica* possède plusieurs caractéristiques d'espèces dioïques, comme un dimorphisme floral de la taille des fleurs (bien que cela

ne soit pas propre aux espèces dioïques), et surtout un sexe-ratio équilibré dans la majorité des populations. Le sexe-ratio montre des valeurs biaisées en faveur des morphes pollinifères uniquement dans deux stades tardifs de la succession et pour l'un d'eux cela n'est pas vrai chaque année. Ce biais de sexe-ratio pourrait être dû à une floraison moins régulière des femelles (le cas de *Chassalia* sp. à La Réunion, Pailler *et al.* 1998) ou encore un mortalité plus grande des femelles dans les très vieux stades (Escarré & Thompson 1991). Mais la majorité des valeurs de sexe-ratio dans les populations échantillonnées n'est pas différentes de l'équilibre et cela peut être le résultat d'une faible contribution des morphes pollinifères via leur fonction femelle dans les populations. Cette hypothèse semble plausible compte tenu de l'investissement femelle des morphes pollinifères qui correspond à seulement 16% de celui des femelles dans la population de MAL. Les graines du morphe pollinifère ont une moins bonne valeur sélective (germination-mortalité des descendants) que celle des femelles. Leur masse est plus faible, et ce paramètre, bien qu'il ne soit pas corrélé dans notre étude à la germination et la mortalité, pourrait fortement influencer la valeur sélective face à la compétition en milieu naturel.

Ainsi, chez *A. borbonica*, le morphe pollinifère produit des graines en plus faible quantité et de moins bonne valeur sélective que les femelles. Cette tendance ainsi qu'une grande variation dans la valeur sélective des descendants issus d'hermaphrodites, sont souvent rencontrées chez les espèces gynodioïques (Gouyon & Couvet 1987, Delph 1990, Ashman 1994, Thompson & Tarayre 2000). A titre d'exemple, chez *Thymus vulgaris*, à partir de croisements contrôlés dans lesquels nous maîtrisons le degré de consanguinité, nous montrons (annexe 1) qu'il existe une plus grande variation dans la valeur sélective des descendants d'hermaphrodites par rapport à celle des descendants issus de femelles et que les descendants d'hermaphrodites souffrent de dépression de consanguinité. Ces variations plus importantes chez les hermaphrodites pourraient avoir pour avoir plusieurs causes : un degré différent de dépression de consanguinité ou encore pourraient être liées aux coûts des gènes restaurateurs. Chez *A. borbonica*, bien que les variations de la fonction femelle des morphes pollinifères pourraient aussi être associées au degré de

consanguinité, cela semble fortement conditionné par le niveau de ressources. De plus, les variations intra morphe inter années pourraient être liées à la fraction de ressources investie dans la fonction femelle les années précédentes.

Par ailleurs, nous avons vu que chez *A. borbonica*, les graines du morphes pollinifère ne semblent quasiment pas contribuer aux générations suivantes. L'espèce apparait donc fonctionnellement dioïque. Aussi, on peut se poser la question du caractère adaptatif de cette plasticité du genre sexuel chez le morphe pollinifère d' *A. borbonica*. C'est ce que nous allons essayer de comprendre dans le chapitre suivant à l'aide d'observations empiriques et de résultats théoriques.

**Tableau I.1** : Années d'échantillonnage (2001=01, 2002=02; 2003=03, 2004=04) et détails des populations échantillonnées dans l'enclos du Grand Brûlé, pour les mesures de morphologie florale, de sexe-ratio, de fécondité et de masse des graines.

| Stade de succession        | Populations | Mesures florales |    |    | Sexe-ratio |    |    |    | Fécondité |    |    |    | Masse des graines |    |    |    |
|----------------------------|-------------|------------------|----|----|------------|----|----|----|-----------|----|----|----|-------------------|----|----|----|
|                            |             | 01               | 03 | 04 | 01         | 02 | 03 | 04 | 01        | 02 | 03 | 04 | 01                | 02 | 03 | 04 |
| JEUNES<br>DANS<br>L'ENCLOS | <b>C61</b>  |                  |    | X  |            |    |    | X  |           |    |    |    |                   |    |    |    |
|                            | <b>C43a</b> |                  | X  | X  |            |    |    | X  |           |    | X  | X  |                   |    |    |    |
|                            | <b>C43b</b> | X                | X  | X  | X          | X  | X  | X  | X         | X  | X  | X  | X                 | X  | X  | X  |
|                            | <b>C43c</b> |                  | X  | X  |            |    |    | X  |           |    |    |    |                   |    |    | X  |
|                            | <b>C31</b>  |                  |    |    |            |    |    | X  |           |    |    |    |                   |    |    |    |
| VIEUX<br>DANS<br>L'ENCLOS  | <b>C19</b>  | X                | X  | X  | X          | X  | X  | X  | X         | X  | X  | X  | X                 | X  | X  | X  |
|                            | <b>KP1</b>  | X                | X  | X  | X          | X  | X  | X  | X         | X  | X  | X  | X                 | X  | X  | X  |
|                            | <b>KP2</b>  |                  |    | X  |            |    |    | X  |           |    |    |    |                   |    |    |    |
| VIEUX<br>HORS<br>ENCLOS    | <b>MAL</b>  | X                | X  | X  | X          | X  | X  | X  | X         | X  | X  | X  | X                 | X  | X  | X  |
|                            | <b>CIL</b>  |                  | X  | X  |            |    |    | X  |           |    |    |    |                   |    |    |    |
|                            | <b>DOD</b>  | X                | X  | X  |            | X  | X  | X  | X         | X  | X  | X  | X                 | X  | X  | X  |
|                            | <b>BEB</b>  | X                | X  | X  |            | X  | X  | X  | X         | X  | X  | X  | X                 | X  | X  | X  |
|                            | <b>MAU</b>  | X                |    |    |            |    |    |    |           |    |    |    | X                 | X  | X  | X  |

#### Encadré I.1 : Mesures végétatives

Dans chacune des populations échantillonnées à La Réunion, excepté pour C76 car la taille des individus y était inférieure à 1m, nous avons déterminé, entre octobre 2003 et avril 2004, le diamètre du tronc (1.30m DBH), la hauteur et la largeur à mi-hauteur de l'arbre ainsi que le nombre de branches chez 852 individus : C61 (n=82), C43a (n=90), C43b (n=136), C43c (n=60), C31 (n=30), C19 (n=104), KP1 (n=134), KP2 (n=30), MAL (n=84), CIL (n=30), BEB (n=67) et DOD (n=65).

Il y a une corrélation positive entre toutes les mesures des traits végétatifs (Diamètre - Hauteur - Largeur - Nombre - de branches). Nous avons donc choisi d'analyser à l'aide d'une ANOVA (PROC GLM) le diamètre.

#### Résultats de ces mesures :

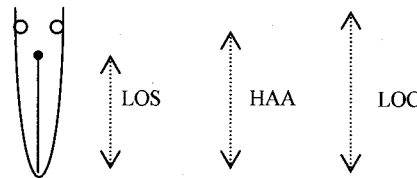
Il n'y a pas de variation significative entre les sexes ( $F_{1, 709} = 0.02, P > 0.5$ ), et l'interaction sexe\*population n'est pas significative ( $F_{11, 709} = 0.76, P > 0.5$ ). Il y a un effet significatif de la population ( $F_{11, 709} = 126, P < 0.001$ ), principalement du au faible diamètre des individus dans les jeunes stades successionnels. Les résultats de ces mesures végétatives montrent que ces traits végétatifs sont tous corrélés entre eux et que leurs valeurs augmentent dans les vieux stades successionnels.

## Encadré I.2 : Détail de l'expérimentation de Morphologie florale

### 1) Mesures Florales

Individus : 10-20 individus par sexe et par population.

Variables : moyenne sur 3 fleurs par individu de la longueur de la **corolle** (LOC) ; de la longueur du **style** (LOS) et de la hauteur des **anthères** (HAA).



Analyse des données : L'analyse statistique a été conduite en utilisant PROC GLM avec pour effets fixes l'effet population, l'effet sexe et leur interaction.

### 2) Mesures de nombre de grains de pollen et d'ovules

Individus : 10 individus par sexe et par population.

Variables : moyenne sur 3 fleurs par individu, du nombre de **grains de pollen** dans un millilitre de solution d'extraction pollinique (Affre *et al.* 1995) sur 2-3 réplicats par fleur ; du nombre d'**ovules** par fleur et la proportion de **stigmates** ouverts.

Analyse des données : L'analyse statistique pour le nombre de grains de pollen et le nombre d'ovules par fleur a été conduite en utilisant PROC GLM avec un effet population, un effet sexe comme effets fixes et leur interaction. Pour la variable proportion de stigmates ouvert, nous avons utilisé PROC GENMOD avec les mêmes effets.

### Encadré I.3 : Détermination de la fécondité, masse des graines et germination

#### 1) Fécondité

Individus : 15-20 individus par sexe et par population.

Variables : nombre d'**inflorescences par nœud** (10-20 nœuds par arbre), nombre de **fleurs** et de **fruits** par inflorescence (5-10 inflorescences par arbre).

Analyse des données : Les analyses statistiques pour le nombre d'inflorescences par nœud et le nombre de fleurs par inflorescence ont été conduites en utilisant PROC GLM avec un effet population, un effet sexe et leur interaction comme effets fixes. Pour la variable ratio du nombre de fruits/nombre de fleurs et la proportion d'individus portant au moins un fruit, nous avons utilisé PROC GENMOD avec les mêmes effets. Pour l'analyse du nombre d'inflorescence par nœud, une mesure végétative (diamètre X hauteur X largeur X nombre de branche / 4) a été incluse en co-variable.

Ces observations ont été faites durant 4 années sur les individus des populations de C43b, C19, KP1 et MAL et durant 3 années pour les populations de DOD et BEB. Dans ces populations les individus ont été étiquetés et ont été suivis chaque année quand cela était possible.

#### 2) Masse des graines

Individus : 15-20 femelles par population + 8-14 morphes pollinifères à MAL.

Variables : moyenne par individu de la **masse de 5 graines**.

Analyse des données : L'analyse statistique pour la masse des graines a été conduite en utilisant PROC GLM avec un effet population chez les femelles et un effet sexe dans la population de MAL.

Ces mesures ont été faites durant 4 ans dans les populations de C43b, C19, KP1, MAL, DOD, BEB, MAU.

#### 3) Germination

Individus : 20 graines par femelle sur 15 femelles par population + 8-20 graines par morphe pollinifère sur 8 morphes pollinifères à MAL.

Variables : Après avoir mis les graines à germer à raison de 10 graines par pot (2/3 terreau, 1/3 sable) en condition de température et d'humidité contrôlées, nous avons relevé la **germination** et la **mortalité** des plantules pendant 10 semaines. Ensuite sur 3 plantules repiquées par pot nous avons mesuré la **hauteur** chaque mois pendant 8 mois.

Analyse des données : les analyses de taux de germination et de mortalité ont été faites à l'aide de PROC GENMOD avec un effet population chez les femelles et un effet sexe dans la population de MAL. L'analyse de la hauteur des plantules a été faite en utilisant PROC GLM avec les mêmes effets. La masse des graines a été mise en co-variable dans l'analyse de la germination, de la mortalité et de la hauteur des plantules.

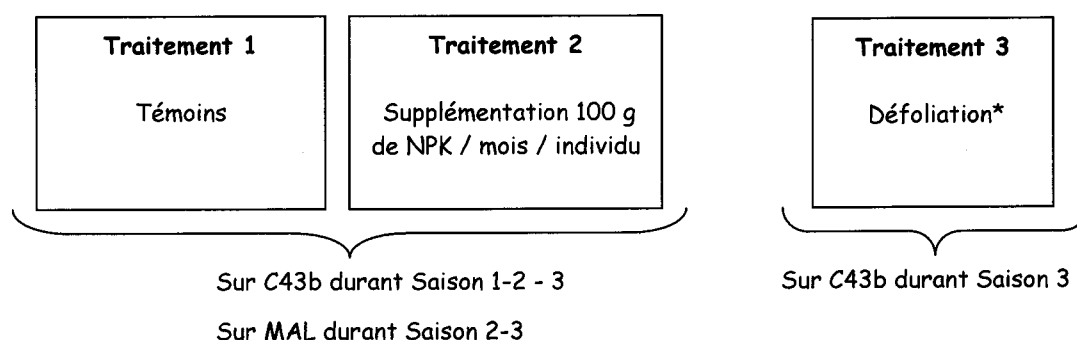
#### Encadré I.4 : Effet des ressources sur les individus des populations de C43b et MAL

Date : Septembre 2001 à Mars 2004. Période décomposée en 3 saisons.

=> **Saison 1** (novembre 2001 à mars 2002); **Saison 2** (novembre 2002 à mars 2003) et **Saison 3** (novembre 2003 à mars 2004).

Populations : 2 populations => C43b et MAL.

Individus : 60 individus sur C43b et 40 sur MAL ; 10 individus par sexe et par traitement.



Le diamètre, la hauteur, la largeur et le nombre de branches de chaque individu ont été mesurés.

Variables : Chaque mois nous avons mesuré sur chaque individu, le nombre d'**inflorescences par nœud** (10 nœuds par arbre), le nombre de **fleurs** et de **fruits** par inflorescence (10 inflorescences par arbre). De plus de octobre 2001 à mai 2002, sur les individus du traitement 1 et 2 de C43b, nous avons mesuré la croissance végétative via le nombre de **nœuds par branche** sur 3 branches / individu.

Analyse des données : Les analyses statistiques pour la croissance végétative ont été conduites en utilisant PROC GLM avec un effet traitement, sexe et leur interaction comme effets fixes. Pour les variables nombre d'inflorescences par nœud et nombre de fleurs par inflorescence nous avons utilisé la procédure PROC MIXED qui permet de faire l'équivalent des procédures PROC GLM avec mesures répétées et corrélées. Nous avons utilisé une matrice de covariance hétérogène et l'effet saison a été incorporé. Il est important de noter que les effets saison et accumulation de ressources sont confondus dans l'effet saison. L'effet individu constitue un effet aléatoire, les effets traitement, sexe et leur interaction sont analysés comme effets fixes. Pour tester l'effet des ressources sur le ratio nombre de fruits / nombre de fleurs, la proportion d'inflorescence et d'individus avec au moins un fruit, nous avons utilisé la procédure PROC GENMOD avec l'option "repeated".

\* Le nombre de nœuds retirés sur les individus du traitement 3 correspond à la moyenne du nombre de noeuds supplémentaires produits par les individus supplémentés à la fin de la saison 1.



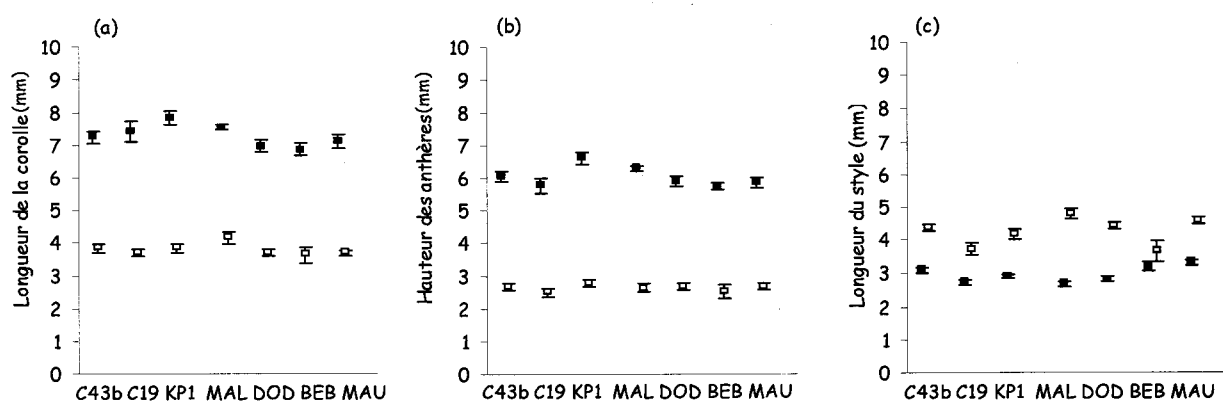


Figure I.1 : (a) Longueur de la corolle, (b) Hauteur des anthères et (c) Longueur du style chez les femelles (□) et chez le morphe pollinifère (■) dans 7 populations d'*Antirhea borbonica*.

Tableau I.2 : Nombre moyen d'ovules et de grains de pollen par fleur et pourcentage de stigmates ouverts chez les morphes femelle et pollinifère dans les populations de C43b et MAL.

|                   | C43b        |                    | MAL        |                    |
|-------------------|-------------|--------------------|------------|--------------------|
|                   | Femelle     | Morphe pollinifère | Femelle    | Morphe pollinifère |
| Ovules            | 1.96 ± 0.02 | 1.90 ± 0.03        | 2.2 ± 0.05 | 2 ± 0.04           |
| Grains de pollen  | 5 ± 2       | 2760 ± 178         | 3 ± 1.8    | 3795 ± 323         |
| Stigmates ouverts | 90.32 %     | 87.3 %             | 95.83 %    | 94.44 %            |

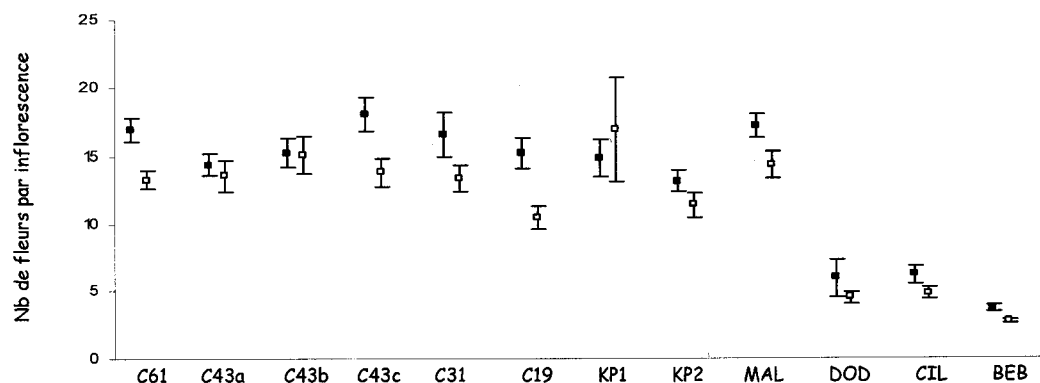
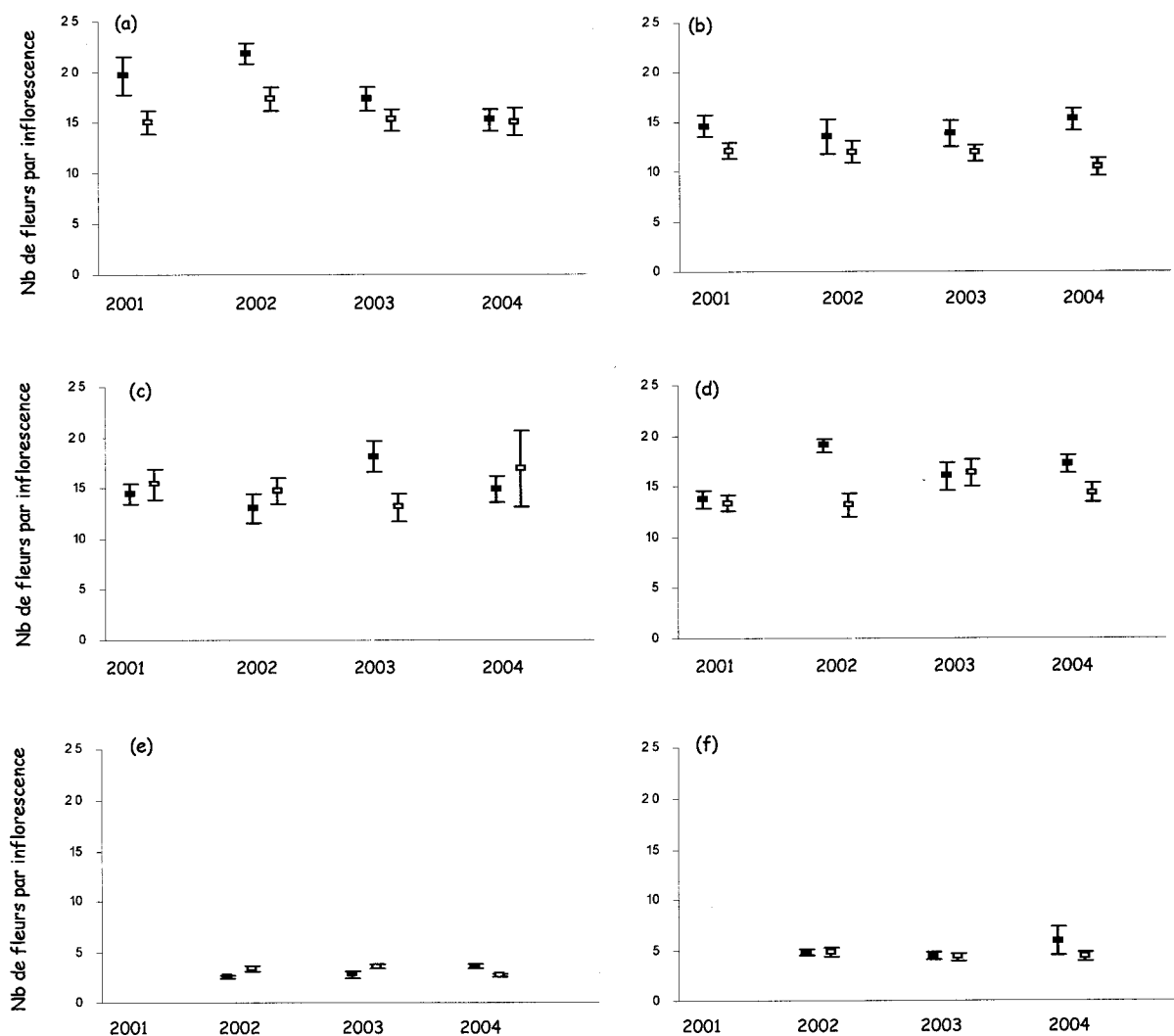
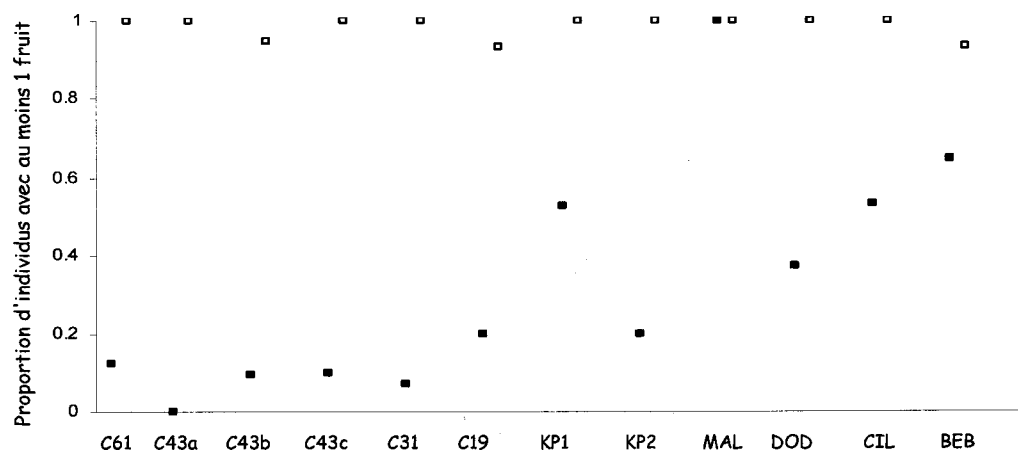


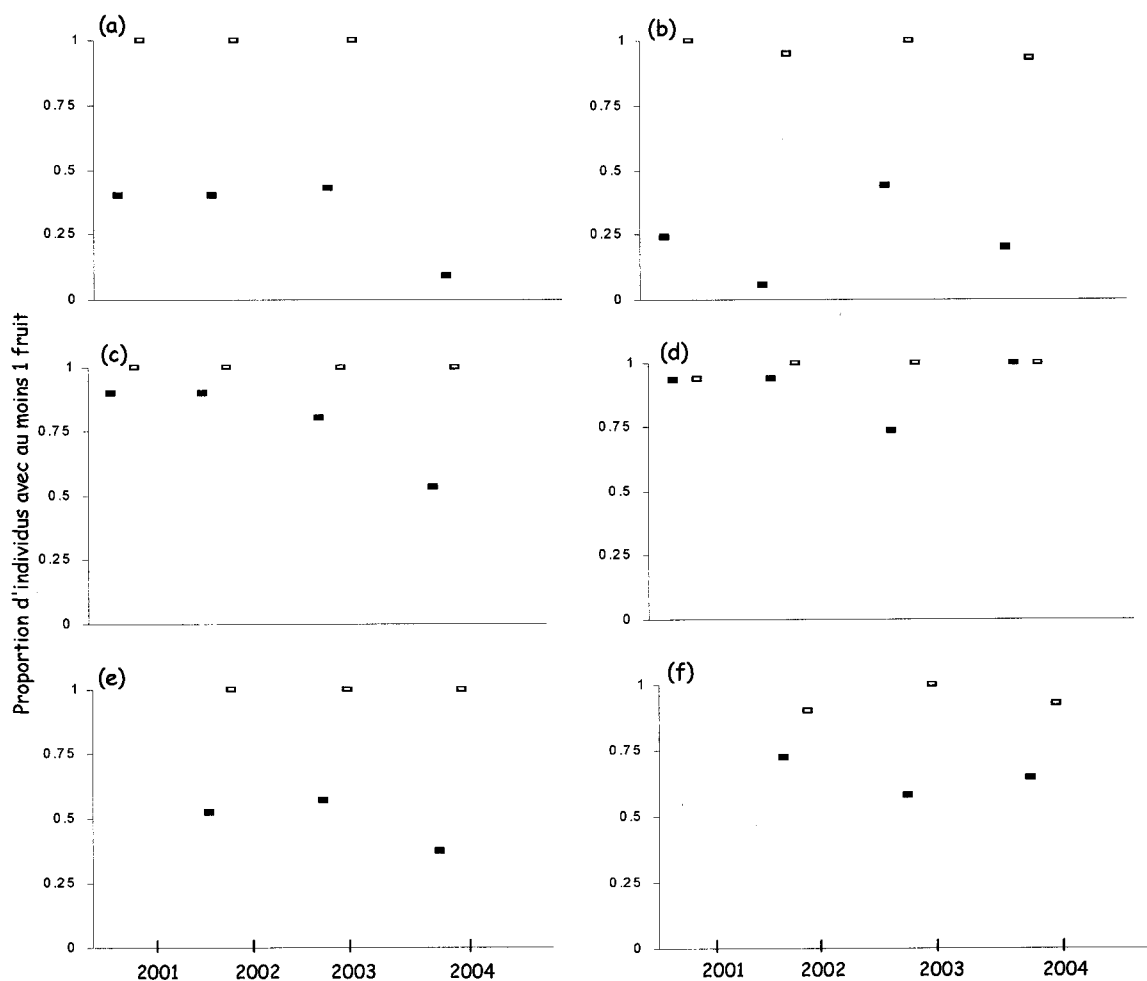
Figure I.2: Nombre de fleurs par inflorescence chez les morphes femelle (□) et pollinifère (■) dans 12 populations d'*Antirhea borbonica* en 2004.



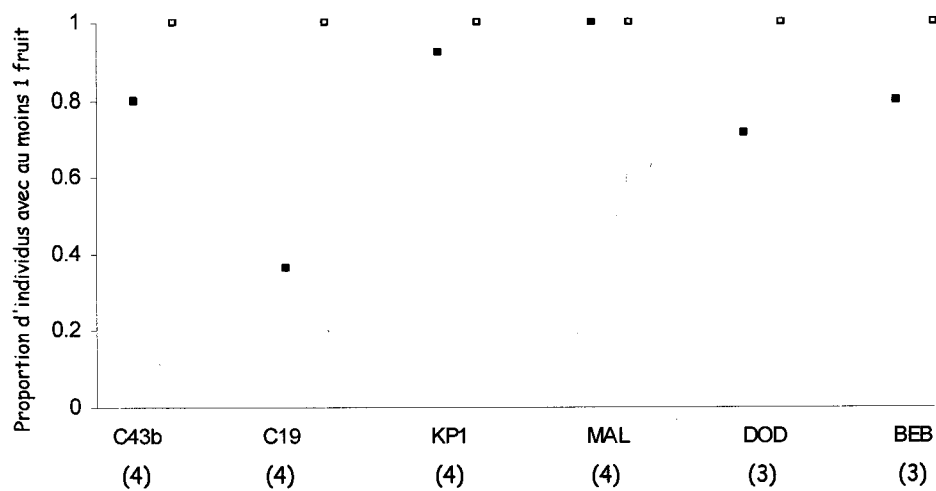
**Figure 1.3 :** Nombre de fleurs par inflorescence chez les morphes femelle(□) et pollinifère (■) d'*Antirhea borbonica* dans les populations de (a) C43b, (b) C19, (c) KP1 et (d) MAL sur 4 ans et dans les populations de (e) BEB et (f) DOD sur 3 ans.



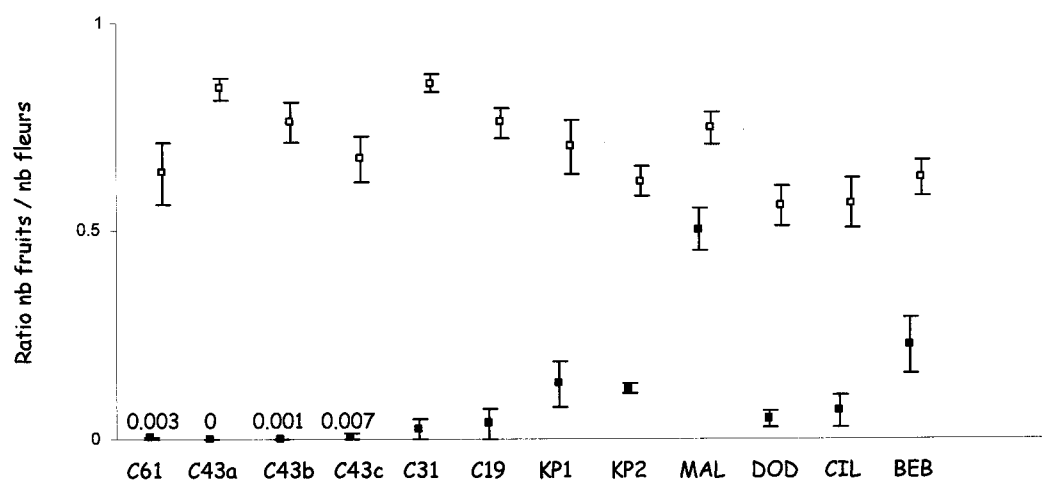
**Figure I.4 :** Proportion de morphes femelle (□) et de morphe pollinifères (■) portant au moins un fruit dans 12 populations d'*Antirhea borbonica* en 2004.



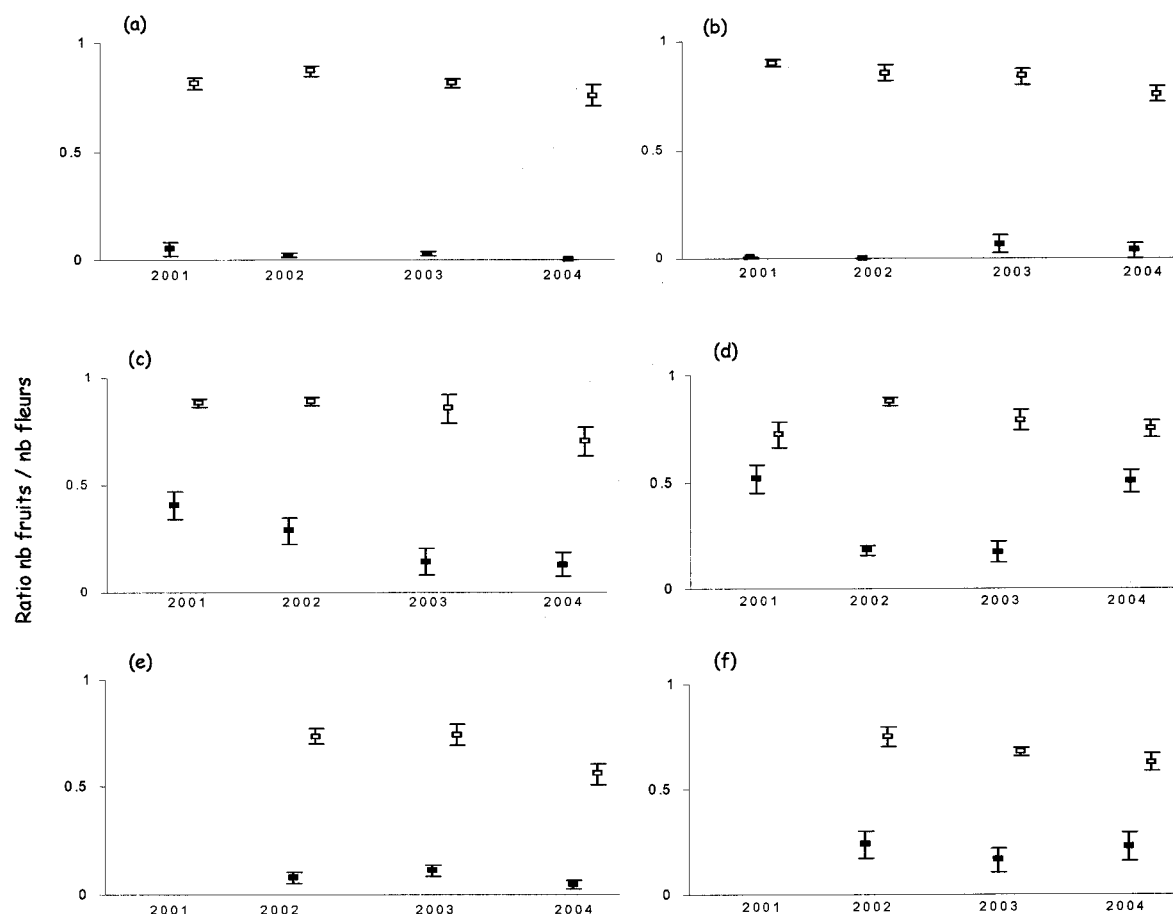
**Figure I.5:** Proportion de morphes femelle (□) et de morphes pollinifère (■) d'*Antirhea borbonica* portant au moins un fruit dans les populations de (a) C43b, (b) C19, (c) KP1 et (d) MAL en 2001, 2002, 2003 et 2004 et dans les populations de (e) DOD et (f) BEB en 2002, 2003 et 2004.



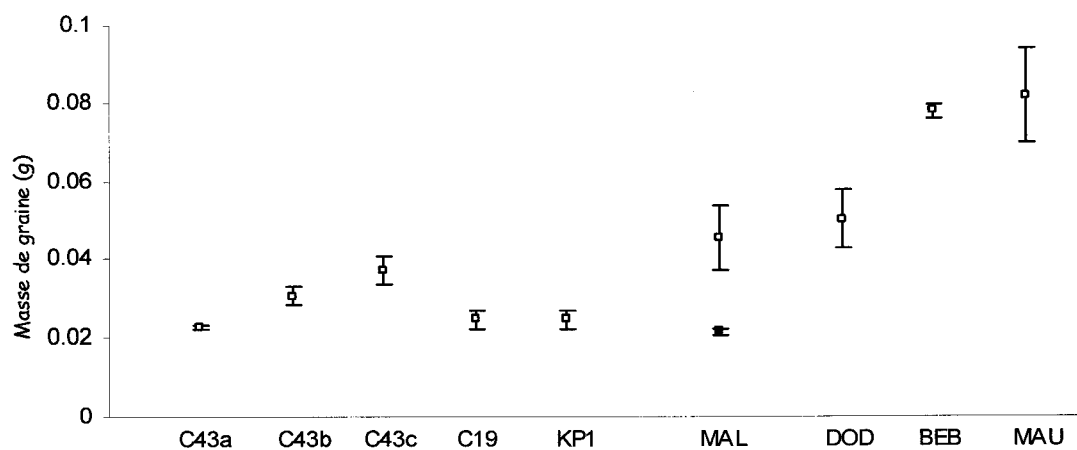
**Figure I.6 :** Proportion de morphes femelle (□) et pollinifère (■) d'*Antirhea borbonica* portant au moins un fruit dans 6 populations sur une période de 3 ou 4 ans. Le nombre d'années de suivi des individus est indiqué entre parenthèses.



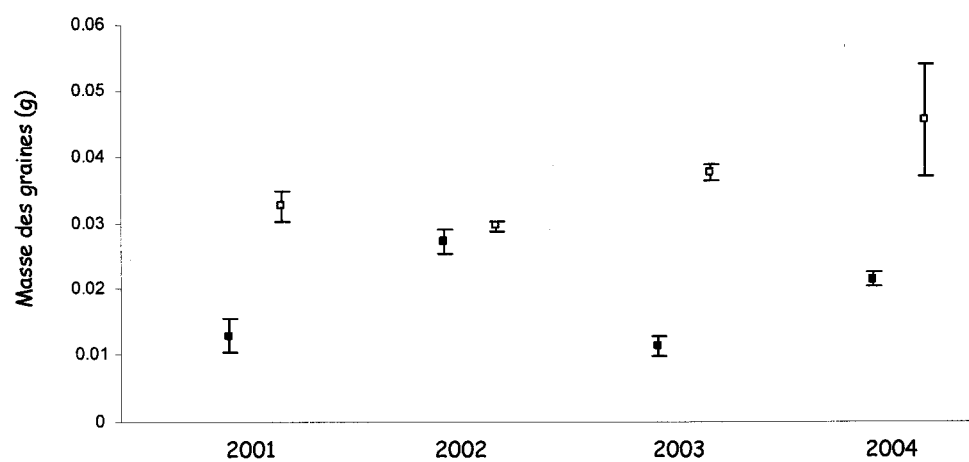
**Figure I.7 :** Ratio du nombre de fruits / nombre de fleurs chez les morphes femelle (□) et pollinifère (■) dans 12 populations d'*Antirhea borbonica* en 2004.



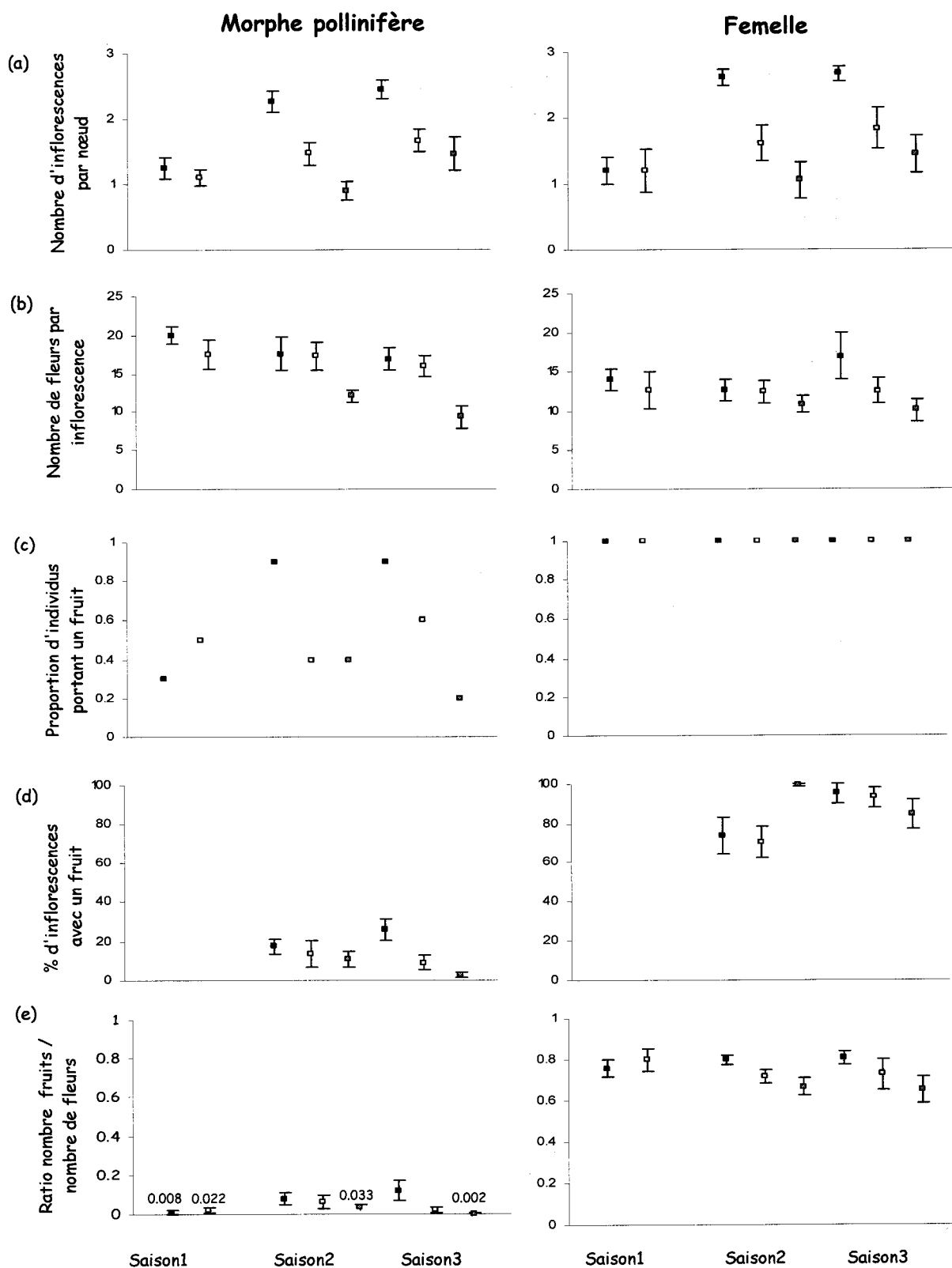
**Figure I.8 :** Ratio du nombre de fruits / nombre de fleurs chez les morphes femelle (□) et pollinifère (■) dans les populations de (a) C43b, (b) C19, (c) KP1 et (d) MAL en 2001, 2002, 2003 et 2004 et dans les populations de (e) DOD et (f) BEB en 2002, 2003 et 2004.



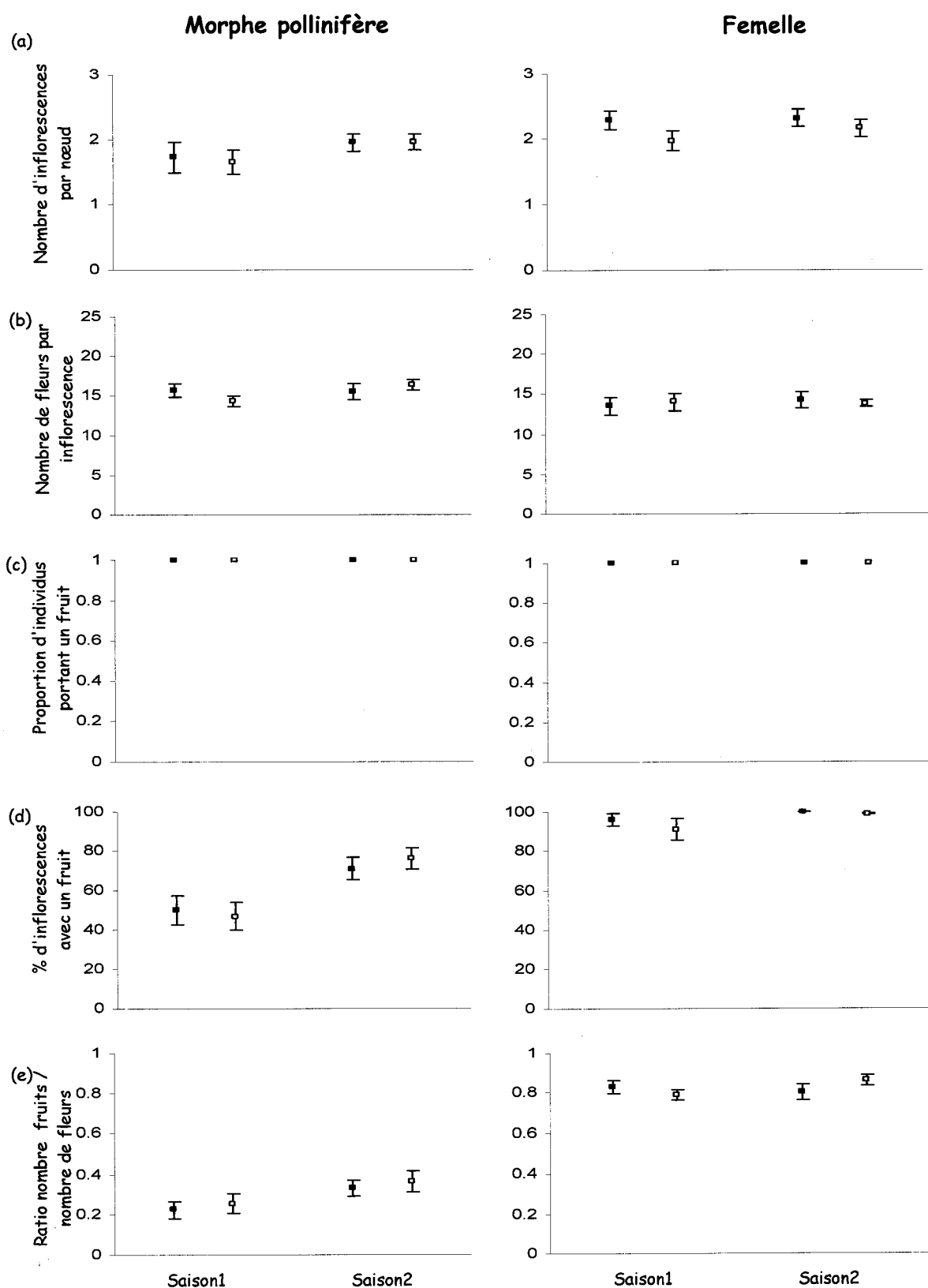
**Figure I.9 :** Masse des graines des femelles (□) d'*Antirhea borbonica* dans 8 populations de La Réunion et 1 population de Maurice en 2004 et des morphes pollinifères (■) dans la population de MAL.



**Figure I. 10 :** Masse des graines des morphes pollinifère (■) et femelle (□) d' *Antirhea borbonica* dans la population de MAL en 2001, 2002, 2003, 2004.

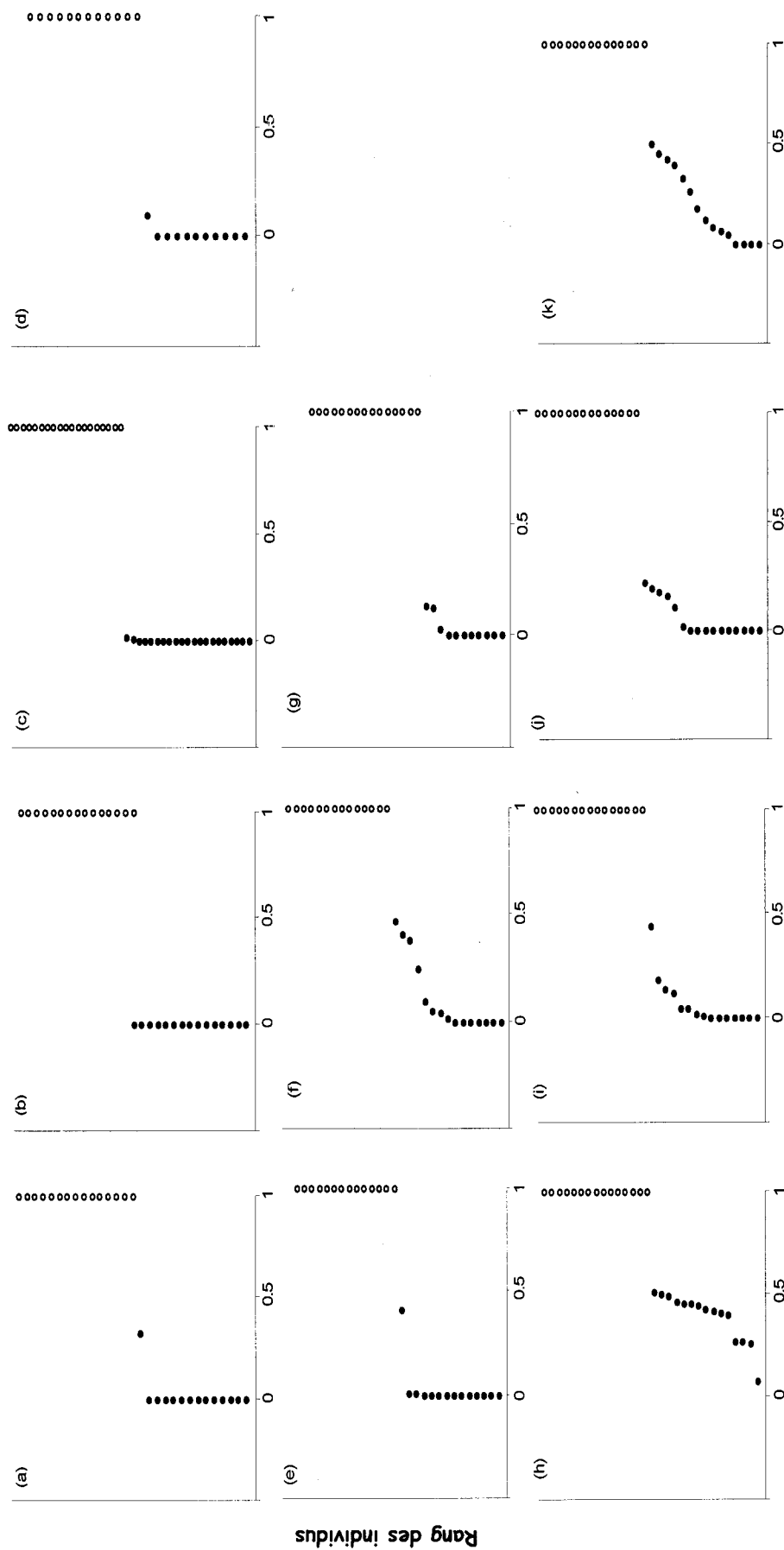


**Figure I.12 :** Variation des traits reproductifs les individus supplémentés (■) témoins (□) et défoliés (▣) d'*Antirhea borbonica* dans la population de C43b : (a) nombre d'inflorescences par nœud, (b) nombre de fleurs par inflorescence, (c) proportion d'individus portant un fruit (d) pourcentage d'inflorescences portant un fruit, (e) Ratio nombre de fruits / nombre de fleurs.



**Figure I.13 :** Variation des traits reproductifs les individus supplémentés (■) témoins (□) d'*Antirhea borbonica* dans la population de MAL : (a) nombre d'inflorescences par nœud, (b) nombre de fleurs par inflorescence, (c) proportion d'individus portant un fruit (d) pourcentage d'inflorescences portant un fruit, (e) Ratio nombre de fruits / nombre de fleurs. NB : Dans le temps, les saisons 1 et 2 de la fig. I.13 correspondent respectivement aux saisons 2 et 3 de la fig. I.12.





**Figure I.14 :** Genre Phénotypique (G), pour les morphes femelle (c) et pollinifère (e) d'*A. borbonica* dans les jeunes populations de l'enclos (a-d), les vieilles populations de l'enclos (e-g) et les vieilles populations hors enclos (h-k). Pour un individu  $i$ , on a  $G_i$  = nombre de fruits produits par  $i$  / [nombre de fruits produits par  $i$  + nombre de fruits pollinifères produits par  $i \times E$ ] avec  $E = \sum$  nombre de fruits produits par tous les individus de la population /  $\sum$  nombre de fleurs pollinifères produites par tous les individus de la population. Un cercle correspond à un individu.

## **CHAPITRE II :**

**EVOLUTION DU SYSTEME DE REPRODUCTION  
ROLE DE LA COMPETITION**

## Préambule

Cette partie théorique correspond à une étude préliminaire et nous avons pour projet de l'approfondir dans les mois à venir.

L'intégralité de cette étude théorique a bénéficié d'une étroite collaboration avec Sandrine Maurice.

## I- INTRODUCTION

Dans le cadre de succession primaire, les conditions biotiques (densité et diversité spécifique) et abiotiques (ressources) varient au cours du temps (Del Moral 1993, Chapin *et al.* 1994). Par exemple, le long d'un gradient de succession primaire la compétition interspécifique peut augmenter (Parrish & Bazzaz 1979). Aussi, il semble être avantageux de posséder une certaine plasticité des traits afin de faire face à des variations de pressions du milieu.

Nous avons vu que le genre sexuel du morphe pollinifère pouvait faire preuve d'une certaine plasticité en terme de fructification chez *Antirhea borbonica*. Mais cette plasticité confère-t-elle un avantage aux individus ? Dans les jeunes stades, le morphe pollinifère fructifie de façon négligeable, mais cette capacité de fructification augmente avec les ressources et donc dans les vieux stades de la succession. Or, nous avons vu que l'efficacité de la fonction femelle des femelles d'*A. borbonica* est au minimum, environ 6 fois supérieure à celle des morphes pollinifères dans la population de MAL. En effet, le morphe pollinifère fournit peu de graines, leur germination est mauvaise et la mortalité des plantules importante par rapport aux femelles. Alors quel "intérêt" possède l'individu à les produire ? Pourquoi cette plasticité est elle maintenue ?

Un premier point important que nous allons considérer concerne l'agrégation spatiale des individus et ses conséquences. Chez beaucoup d'espèces ornithochores la majorité des graines est dispersée à de faibles distances des pieds maternels (Alcantara *et al.* 2000). La plus grande production de fruits et la viabilité plus importante des graines des femelles par rapport aux morphes pollinifères peut conduire à une plus grande compétition entre les plantules issues de femelles. La compétition locale favoriserait ainsi les descendants issus des morphes pollinifères en diminuant l'efficacité de la fonction femelle des femelles dans les vieux stades de la succession. La capacité du morphe pollinifère à fructifier dans ces vieux stades pourrait, dans ces conditions être maintenue.

Dans ce chapitre, nous allons essayer de définir comment la fréquence des morphes pollinifères, sous certains niveaux de ressources et de compétition, devrait

évoluer. Dans les modèles d'évolution des phénotypes sexuels les plus simples, la valeur sélective des individus est proportionnelle au nombre de gamètes produits (ou au nombre de graines pour la fonction femelle). Dans cette étude, nous allons tenir compte de la dépression de consanguinité et de la survie des plantules en relation avec la densité.

Pour se faire, nous estimerons, dans un premier temps, la possibilité d'autocompatibilité des morphes pollinifères et la densité de plantules trouvées sous les pieds des individus d'*A. borbonica*. Puis, nous inclurons les paramètres de dépression de consanguinité et de compétition entre plantules dans un modèle d'évolution du phénotype sexuel afin de calculer la fréquence attendue des morphes dans la population. Comme la production de fruits chez *A. borbonica* semble être influencée par le niveau de ressources qui varie entre jeunes et vieux stades successionnels, ce paramètre sera aussi pris en compte dans notre modèle.

## II- AUTOCOMPATIBILITE

Le morphe pollinifère est-il autocompatible ?

Sur 4 femelles et 10 morphes pollinifères en conditions naturelles dans la population de MAL, nous avons posé 5 filets "*insect-proof*" sur des inflorescences en boutons stade terminal dont le nombre de fleurs est connu. Les filets sont laissés durant 2 mois. A la fin de cette période les fleurs ensachées avaient soit donné un fruit soit disparues, laissant visible la trace du pédoncule floral. Nous avons alors noté le nombre de fruits produits sous les filets et le nombre de fruits produits par des fleurs laissées libres (Tab. II.1). Chez le morphe pollinifère 11,4 % de fruits ont été produits sous filet relatif à la libre pollinisation (Tab. II.1).

L'existence de fruits sous filet nous permet de dire que les morphes d'*Antirhea borbonica* ont la possibilité de s'autoféconder. Mais le taux d'autofécondation ne peut être déduit de cette expérimentation. Chez les femelles, aucun fruit n'a été observé sous filet.

### III- COMPETITION ENTRE PLANTULES

La densité de plantules sous les pieds femelles est-elle plus importante que celle trouvée sous les morphes pollinifères ?

Afin d'avoir une idée de la compétition entre les plantules produites par un individu d'*A. borbonica*, nous avons compté le nombre de plantules sous 10 femelles et 12 morphes pollinifères de la population C43b, qui est un très jeune stade de la succession, et 11 femelles et 12 morphes pollinifères de la population de MAL, qui est un vieux stade successional. Nous avons relevé le nombre de plantules d'*A. borbonica* et d'autres espèces présentes sous la canopée des individus d'*A. borbonica*. A titre de comparaison, ces mesures ont aussi été faites sous des individus adultes d'*Agauria salicifolia*\*. Pour les détails de cette étude voir encadré II.1.

Plusieurs résultats intéressants sont distinguables :

(i) Les plantules d'autres espèces sont plus nombreuses au m<sup>2</sup> que celles d'*A. borbonica* sous tous les individus échantillonnés ( $t = -8.21$ ,  $P < 0.0001$ ) quelque soit l'espèce, le morphe et la population (Tab. II.2).

(ii) Le nombre de plantules trouvées sous les individus de la population C43b est supérieur à celui trouvé sous les individus de MAL (Tab. II.2) et cela aussi bien pour les plantules d'*A. borbonica* sous *A. salicifolia* ( $F_{39,1} = 52.09$ ,  $P < 0.0001$ ) et sous *A. borbonica* ( $F_{41,1} = 40.77$ ,  $P < 0.0001$ ) que pour les plantules d'autres espèces sous *A. salicifolia* ( $F_{39,1} = 10.31$ ,  $P < 0.005$ ) et sous *A. borbonica* ( $F_{41,1} = 21.99$ ,  $P < 0.0001$ ). L'installation des plantules d'*A. borbonica* est très faible à MAL où l'effet de la compétition sur la régénération pourrait être très fort.

(iii) On observe des différences du nombre de plantules sous les deux morphes sur la population de C43b. Sous les femelles d'*A. borbonica*, il y a plus de plantules au m<sup>2</sup> que sous les morphes pollinifères et cela aussi bien pour les plantules d'*A. borbonica* ( $F_{20,1} = 19.58$ ,  $P < 0.005$ ) que pour les plantules d'autres espèces ( $F_{41,1} = 6.77$ ,  $P < 0.05$ ). Ce résultat est logique pour les plantules d'*A. borbonica* compte tenu que le

\* *Agauria salicifolia* est une espèce ligneuse pionnière de la famille des Ericaceae. Les individus sont hermaphrodites. Cette espèce anémophile précède *Antirhea borbonica* dans la succession primaire où elle pourrait servir de perchoir facilitant l'arrivée d'*A. borbonica*. *A. salicifolia* persiste aussi dans les très vieux stades de succession.

nombre de plantules d'*A. borbonica* sous un individu est corrélé au nombre total de fruits produits par cet individus dans la population de C43b ( $R = 0.69$ ,  $P < 0.05$ ). A MAL le nombre de plantules d'*A. borbonica* n'est pas supérieur sous les femelles par rapport aux morphes pollinifères ( $F_{21,1} = 0.82$ ,  $P > 0.1$ ), mais il y a plus de plantules d'autres espèces sous les femelles ( $F_{41,1} = 6.77$ ,  $P < 0.05$ ).

(vi) Quelque soit la population et le morphe considérés, il existe une corrélation entre le nombre total de fruits produits et les plantules d'autres espèces trouvées sous les individus ( $R = 0.64$ ,  $P < 0.0001$ ), ce qui pourrait être la conséquence d'une attraction plus grande des disperseurs lorsque la production de fruits augmente.

(v) Sur la population de C43b, le nombre de plantules de petite taille (classe 1) sous les individus est plus important ( $t = -4.31$ ,  $P < 0.0005$ ) que celui des plantules de taille moyenne (classe 2), ce qui pourrait traduire une mortalité densité dépendante due à la compétition. Notons que cette sélection semble plus forte sous les femelles puisque la différence du nombre de plantules classe 1 et 2 est beaucoup plus importante sous ce morphe. A MAL, nous n'observons pas de différence entre le nombre de plantules de classe 1 et 2 sous les femelles ( $t = -1.84$ ,  $P < 0.05$ ) et sous les morphes pollinifères ( $t = -1.66$ ,  $P < 0.1$ ). Le faible nombre de plantules de classe 1 nous fait penser que l'effet de la compétition pourrait agir dès la germination dans la population de MAL.

Ces résultats suggèrent que l'établissement des plantules est limité à MAL où la compétition est peut être plus forte que sur C43b. Sur C43b la compétition pourrait être plus forte sous les femelles que sous les morphes pollinifères.

#### IV ETUDE THEORIQUE

##### 1- Hypothèses et paramètres

Le modèle est un modèle phénotypique, c'est-à-dire qu'il n'existe aucune contrainte génétique sur le déterminisme sexuel. Soit, une population, dont les

individus ont une stratégie  $X$  telle qu'ils investissent une fraction  $r$  de leurs ressources disponibles dans la fonction mâle. Si les individus allouent  $r = 0$  à la fonction mâle, leur sexe est femelle. Si les individus allouent  $r = 1$  à leur fonction mâle alors leur sexe est mâle. Si les individus allouent  $0 < r < 1$ , alors ils sont considérés hermaphrodites. Le but du modèle est de définir la fréquence des morphes sexuels dans la population à l'équilibre, en fonction du niveau de ressources du site, de la survie des plantules densité dépendante et de la dépression de consanguinité dont peuvent souffrir les descendants d'hermaphrodites. En d'autres termes, nous allons déterminer pour différentes valeurs du niveau de ressources, de la survie des plantules densité dépendante et de la dépression de consanguinité, quel est le système de reproduction tel que les individus soient à l'ESS (stratégie évolutivement stable).

$R$  est le niveau de ressources global disponible pour l'individu.  $R$  est une propriété de la population, tous les individus d'une même population ont le même niveau de ressources disponibles.

$r$  est la proportion des ressources investie dans la fonction mâle et  $(1-r)$  la proportion des ressources investie dans la fonction femelle par un individu.

$k_1$  et  $k_2$ : fonctions décrivant le "rendement" de l'investissement dans une fonction en termes de production de graines et de pollen, respectivement.

$t$  est le taux d'allofécondation des individus hermaphrodites.

$d$  est la dépression de consanguinité sur les graines issues d'autofécondation.

Le taux de germination de base, pour des graines issues d'allofécondation, est le même pour tous les individus et n'entre donc pas dans les équations. En revanche, le taux de germination des graines issus d'autofécondation est diminué du facteur  $d$ .

On considère que les graines ont une dispersion limitée et que la probabilité de survie des plantules diminue quand la densité de plantules augmente. La fonction de compétition choisie est celle proposée par Berverton & Holt (1957). Les paramètres de cette fonction sont :

$s_0$ : Probabilité de survie des plantules en absence de compétition.

$a$ ,  $b$ : intensité de la sélection, celle-ci augmente quand  $a$  et  $b$  augmentent.



2- Fonctions et équations utilisées

La production de graines en fonction de  $r$  est :

$$\text{Fruit}(r) = [R(1-r)]^{k1}$$

La production de graines germées d'un hermaphrodite faisant de l'autofécondation est :  $[R(1-r)]^{k1} [(1-d)(1-t)+t]$

La probabilité de survie des plantules densité dépendante, en fonction des graines produites et germées et donc de  $r$ , est donnée par :

$$\text{Dens}(r) = s_0 / 1+a [ (R(1-r))^{k1} [(1-d)(1-t)+t] ]^b \quad \text{pour les hermaphrodites.}$$

$$\text{Dens}(r) = s_0 / 1+a [ (R(1-r))^{k1} ]^b = s_0 / 1+a (R^{k1})^b \quad \text{pour les femelles.}$$

La production de pollen en fonction de  $r$  est :

$$\text{Pollen}(r) = (Rr)^{k2}$$

Les valeurs sélectives des individus ne dépendent pas seulement de leur production de pollen ou de graines mais de ce que font les autres individus de la population. Si  $f$ ,  $h$ ,  $m$  sont respectivement les fréquences des femelles, des hermaphrodites et des mâles dans la population, et si  $r$  est l'allocation sexuelle des hermaphrodites alors :

La fonction femelle en allo-fécondation de la population est :

$$\begin{aligned} F_{\text{allof-tot}} &= f \text{Fruit}(0) \text{Dens}(0) + h + \text{Fruit}(r) \text{Dens}(r) \\ &= f R^{k1} s_0 / (1+a (R^{k1})) + h + (R(1-r))^{k1} s_0 / (1+a [ (R(1-r))^{k1} [(1-d)(1-t)+t] ]^b) ; \end{aligned}$$

et la fonction mâle de la population est :

$$\begin{aligned} M_{\text{tot}} &= m \text{Pollen}(1) + h \text{Pollen}(r) \\ &= m R^{k2} + h (Rr)^{k2} \end{aligned}$$

On a alors les fitness (valeurs sélectives) suivantes pour les différents types d'individus:

Valeur sélective d'une femelle :

$$WF = R^{k1} s_0 / [1+a (R^{k1})^b]$$

Valeur sélective d'un mâle :

$$WM = F_{\text{alloe-tot}} R^{k_2} / M_{\text{tot}}$$

Valeur sélective d'un hermaphrodite :

$$WH = (t + 2(1-t)(1-d)) (R(1-r))^{k_1} s_0 / (1+a [(R(1-r))^{k_1} ((1-d)(1-t)+t)]^b) + F_{\text{alloe-tot}}(Rr)^{k_2} / M_{\text{tot}}$$

### 3- Les cas étudiés

Nous allons étudier deux cas qui diffèrent par les courbes de production de fruits et de pollen en fonction de l'investissement dans la fonction mâle ou femelle. A partir de ces deux cas, nous allons faire varier les ressources globales du site  $R$ , le taux d'allo-fécondation  $t$  des hermaphrodites avec une dépression de consanguinité constante  $d = 0.7$  et l'impact de la densité sur le taux de survie des plantules c'est-à-dire  $a$  et  $b$ . Nous verrons alors comment évoluent les fréquences des différents morphes (femelles, mâles et hermaphrodites) et quel système de reproduction est attendu dans les différentes situations (Tab. II.3 et Fig. II.1).

#### Cas 1 : $k_1 = 1.5$ et $k_2 = 1$

La valeur de  $k_1$  est choisie de telle sorte que la production de fruits (Fig. II.2a) d'un individu investissant peu dans la fonction femelle soit négligeable comparée à la production d'une femelle. Cela semble être le cas chez *Antirhea borbonica*. La valeur de  $k_2$  est choisie de telle sorte que la production de pollen (Fig. II.2b.) soit proportionnelle à l'investissement dans la fonction mâle.

Notons qu'avec ces valeurs de  $k_1$  et  $k_2$ , sans compétition et sans autofécondation avec un niveau de ressource  $R = 1$ , le système de reproduction à l'équilibre est la dioécie.

#### Cas 2 : $k_1 = 0.8$ et $k_2 = 1.5$

Dans ce cas 2, comparativement au cas 1, nous allons permettre un plus grande production de fruits quand un individu investi peu dans la fonction femelle (Fig. II.2c) et une production de pollen qui n'est plus proportionnelle (Fig. II.2d) à l'investissement dans la fonction mâle.

Notons qu'avec ces valeurs de  $k_1$  et  $k_2$ , sans compétition et sans autofécondation avec un niveau de ressource  $R = 1$ , le système de reproduction à l'équilibre est la gynodioécie.

#### 4- Résultats

Les résultats ont été obtenus en lançant la résolution des équations sur le logiciel MATHEMATICA version 4. 2.

##### Cas 1 : Population dioïque au départ (annexe 4)

On note que, sans effet de la densité des plantules sur la survie des descendants, lorsque les ressources augmentent, les hermaphrodites ne sont pas favorisés et le système de reproduction reste dioïque. Mais lorsqu'il existe un effet de la densité sur la survie des plantules, la dioécie ne semble plus stable quand le niveau de ressource augmente. Il y a une évolution vers l'hermaphrodisme en passant par un stade androdioïque. Cette évolution se fait d'autant plus vite que l'effet de la densité sur la survie des plantules est grand et le taux d'autofécondation est petit.

Malgré tout, la dioécie réussit à se maintenir avec un faible niveau de ressource si l'effet de la densité sur la survie des plantules est faible. Ou encore avec un niveau de ressources un peu plus grand, si l'effet de la densité sur la survie des plantules reste faible et qu'il existe 90% d'autofécondation.

##### Cas 2 : Population gynodioïque au départ (annexe 4)

Lorsque l'autofécondation n'est pas permise pour les hermaphrodites et que la survie des plantules n'est pas densité dépendante, la gynodioécie n'est pas déplacée par un autre système de reproduction. Mais si la survie des plantules est densité dépendante alors la fréquence des femelles diminue quand les ressources augmentent et cela d'autant plus rapidement que l'effet de la densité sur la survie des descendants est grand. En revanche, si le niveau de ressources est très faible et que

l'effet de la densité sur les plantules n'est pas trop important, les hermaphrodites sont défavorisés avec une intensité dépendante du taux d'autofécondation, la dioécie semble alors privilégiée.

## V- DISCUSSION

Les résultats majeurs de ce chapitre sont : (i) la faible densité de plantules sous les individus de la population de MAL par rapport à C43b, (ii) la forte densité de plantules et la différence dans le nombre de plantules de petite et de taille moyenne sous les femelles de la population de C43b, ainsi que (iii) l'importance de la survie des plantules densité dépendante sur la fréquence des femelles, observée à partir de l'étude théorique. Nous allons dans un premier temps, discuter brièvement les résultats de l'étude théorique puis, nous nous intéresserons aux implications pour le maintien d'une variation du genre sexuel tel que nous l'observons chez *A. borbonica*.

Notre étude théorique met en évidence la survie des plantules densité dépendante comme un facteur qui contre-sélectionne fortement les femelles face aux hermaphrodites dans une population. Cette contre-sélection des femelles conduit les populations dioïques à une invasion par les individus hermaphrodites, en passant par une étape d'androdioïque. Mais l'espace des paramètres pour lesquels nous obtenons l'androdioécie est réduit. De plus, la fréquence des mâles, relative à celle des hermaphrodites, est faible et une augmentation du niveau de ressources conduit très rapidement à un système hermaphrodite.

Il en est de même pour l'évolution de la gynodioécie, la fréquence des femelles diminue très vite lorsque le niveau de ressources du site augmente et qu'il existe un effet de la densité sur la survie des plantules. Il est remarquable de noter qu'en présence d'un taux d'autofécondation important associé à une forte dépression de consanguinité, l'évolution du système de reproduction se fait dans le même sens, mais le passage de la dioécie ou de la gynodioécie à l'hermaphrodisme nécessite un niveau de ressource global plus important. Même si une forte dépression de consanguinité défavorisant les hermaphrodites existe, cette pression de sélection ne suffit donc pas

à maintenir la dioécie lorsque le niveau de ressources et l'effet de la densité sur la survie des plantules sont importants. Mais si le niveau de ressources est assez faible pour que les femelles soient favorisées face aux hermaphrodites quant à la production de fruits (sans qu'il existe un effet trop fort effet de la densité sur la survie des plantules) et que les hermaphrodites se reproduisent principalement en autofécondation avec une forte dépression de consanguinité alors la dioécie est maintenue.

Ainsi, il apparaît clairement que (i) si le niveau de ressources est assez important pour que les hermaphrodites puissent produire assez de fruits pour contribuer de façon non négligeable à la génération suivante et (ii) s'il existe un effet de la densité sur la survie des plantules, alors l'hermaphrodisme sera le système de reproduction sélectionné dans la majorité des cas. Alors pourquoi, chez *A. borbonica*, les morphes pollinifères n'envahissent ils pas les vieilles populations ?

La différence d'abondance de plantules de petite taille et de taille moyenne sous les femelles de la population de C43b montre qu'il pourrait exister une mortalité densité dépendante des plantules. Cette mortalité pourrait être liée à une compétition qui serait alors plus forte pour les plantules issues de femelles pour deux raisons, (i) le nombre de plantules sous les femelles de la population de C43b est plus important que ce que l'on compte sous les morphes pollinifères et (ii) la compétition serait très importante dans les vieux stades puisqu'à MAL il n'y a quasiment pas d'installation de plantules et cela aussi bien sous les femelles qui produisent beaucoup de fruits que sous les morphes pollinifères. Tout laisse donc penser que l'avantage des femelles d'*A. borbonica* (6 fois plus selon nos résultats du chapitre 1) pourrait être beaucoup moins important que ce que l'on a énoncé. Et la capacité de fructification des morphes pollinifères avec les ressources favoriserait ce morphe dans les vieux stades. Ainsi, en accord avec les résultats de notre étude théorique, la fréquence du morphe pollinifère d'*Antirhea borbonica* devrait augmenter dans les vieux stades allant peut être jusqu'à l'invasion.

Mais les résultats du chapitre précédent montrent qu'il n'y a pas de différence de sexe-ratio entre les stades et que les valeurs du sexe-ratio ne sont pas biaisées en

faveur du morphe pollinifères dans les stades tardifs. Les observations empiriques sur *A. borbonica* ne sont donc pas en accord avec les prédictions de notre modèle. La compétition entre plantules pourrait ne pas être une forte pression de sélection contre les femelles chez cette espèce. La dispersion et la facilitation sont deux paramètres que nous n'avons pas considérés et qui peuvent diminuer l'effet de la compétition entre plantules. En effet, si la dispersion des graines a lieu plus loin qu'à proximité du pied mère, la nucléation importante que pourraient subir les femelles diminuerait. Ou encore, s'il existait des phénomènes de facilitation, alors la nucléation sous le pied mère pourrait se traduire par un équilibre entre les coûts dus à la compétition et les bénéfices dus à l'agrégation (Callaway & Walker 1997). Le niveau d'installation très faible des plantules d'*A. borbonica* dans la population de MAL peut être le résultat du caractère pionnier de l'espèce. La germination et l'installation pourraient être difficile en milieu fermé. La possibilité de régénération de l'espèce dans ce milieu pourrait être fortement dépendante de la dispersion des graines sur des trouées engendrées par exemple par des cyclones, phénomène très courant à La Réunion (Strasberg 1996). Si l'on considère ce processus de dispersion, intra population, il semble que les choses soient alors en faveur des femelles. En effet, les femelles produisent beaucoup plus de fruits que les morphes pollinifères, elles pourraient donc attirer beaucoup plus de disperseurs. La corrélation du nombre de plantules d'autres espèces et de la production de fruits soutient cette hypothèse. Par ailleurs, si la dispersion intervient, il est alors possible que les plantules trouvées sous les morphes pollinifères ne soient pas les descendants de ce morphe. La faible valeur sélective des graines issues du morphe pollinifère face aux graines des femelles et le nombre équivalent de plantules trouvées sous les morphes pollinifères et les pieds d'*Agauria salicifolia* dans la population de C43b, appuient l'idée selon laquelle, les morphes pollinifères joueraient le rôle de perchoirs pour les oiseaux dispersant principalement des graines issues de femelles. Une analyse de paternité nous permettrait de tester cette hypothèse.

Les femelles pourraient donc présenter un double avantage face aux morphes pollinifères chez *A. borbonica*. Premièrement, une plus grande production de graines

avec une meilleure valeur sélective par rapport aux morphes pollinifère et deuxièmement, une meilleure dispersion de leurs fruits comparativement aux fruits des morphes pollinifères. Ce double avantage pourrait expliquer le maintien de la dioécie chez *A. borbonica* et donc un sexe ratio de 1:1 au sein de presque toutes les populations.

Par ailleurs, à l'échelle de la métapopulation, en plus de la compétition, nous avons vu que la nucléation des descendants des femelles, pourrait favoriser la colonisation et l'expansion des hermaphrodites. Mais cela n'est pas le cas chez *A. borbonica*, les jeunes stades ne sont effectivement pas dominés par des morphes pollinifères fructifiant. Ces observations ont deux explications majeures. La première réside dans la faible production de fruits des morphes pollinifères dans les stades jeunes de la succession sous l'influence de la limitation en ressources de ces stades. La seconde consiste en un phénomène de facilitation. La nucléation des plantules des femelles sur les jeunes stades pourrait ne pas constituer un trop fort handicap. En effet, compte tenu du niveau en ressources des jeunes stades de la succession, l'agrégation des plantules à proximité des pieds mères et des arbres perchoirs pourrait favoriser l'installation. Il a souvent été souligné (Debussche & Isenmann 1994, Callaway 1995) l'importance des effets de facilitation et de plante nurse dans les premiers stades de succession primaire. Cela pourrait donc contre balancer (au moins en partie) le coût de la compétition entre les plantules issues des femelles dans ces stades (Callaway & Walker 1997).

En conclusion, notre étude théorique montre qu'une plasticité du genre sexuel permettant l'augmentation de la fonction femelle des morphes pollinifères avec les ressources pourrait représenter une plasticité adaptative lorsqu'il existe de la compétition entre plantules. Mais chez *A. borbonica*, nous n'observons pas d'augmentation de la fréquence du morphe pollinifère dans les vieux stades successionnels. La compétition, qui est un facteur clé des résultats théoriques ne semble donc pas constituer pas un paramètre déterminant sur le caractère adaptatif de la plasticité du genre sexuel chez *A. borbonica*. La contribution des morphes pollinifères pourrait être essentiellement mâle malgré une légère production de

graines. Aussi, nous pouvons raisonnablement penser que le système de reproduction de cette espèce est dioïque quelque soit la population et le stade successional. De cette manière, il semble peu probable que la capacité de fructification du morphe pollinifère puisse traduire une plasticité adaptative chez *A. borbonica*. L'effet d'une contrainte résiduelle liée à une évolution récente de la dioécie nous paraît plus probable pour expliquer la capacité de fructification des morphes pollinifères chez cette espèce. Ainsi, le système de reproduction d'*A. borbonica* nous semble correspondre à un stade avancé de la dioécie et la plasticité du genre sexuel chez le morphe pollinifère pourrait se rapporter à un stade transitoire. Ceci dit, si la contre sélection des morphes pollinifères capables de fructifier est faible, alors cette plasticité du genre sexuel pourrait être maintenue conférant à l'espèce le statut de dioïque partielle, "leaky dioecy", qui est un système trouvé chez beaucoup d'autres espèces dans les îles (Baker & Cox 1984, Humeau *et al.* 1999).



## Encadré II. 1 : Nombre de plantules sous la canopée des individus

**Date :** 2003

### **Populations et Individus :**

10 femelles et 12 morphes pollinifères d'*A. borbonica* et 9 individus adultes d'*Agauria salicifolia* de la population C43b, 11 femelles et 12 morphes pollinifères d'*A. borbonica* et 10 individus adultes d'*Agauria salicifolia* de la population de MAL. La hauteur, la largeur minimale, la largeur maximale, le diamètre du tronc et le nombre de branches sont estimés pour chacun des individus. Nous avons essayé de standardiser ces mesures dans le choix des individus échantillonnés. Nous avons défini la surface au sol de la canopée selon l'équation de l'aire d'une ellipse :  $[Largeur\ max * Largeur\ mini * \pi] / 4$ .

Pour les individus d'*A. borbonica*, le nombre d'inflorescence par nœud (sur 10 nœuds échantillonnés au hasard), le nombre de fleurs et de fruits par inflorescence (sur 10 inflorescences échantillonnées au hasard) sont estimés deux fois dans la saison de floraison-fructification. Une estimation du nombre de fruits total produit par un individu est donnée par  $Nb\ branches * nb\ moyen\ d'inflorescences\ par\ noeud * nb\ moyen\ de\ fruits\ par\ inflorescence$ .

**Variables :** Nous avons compté de façon exhaustive sur toute la surface de la canopée au sol :

- 1) La totalité des plantules d'*A. borbonica* de taille inférieure à 10 cm nommées classe 1.
- 2) La totalité des plantules d'*A. borbonica* de taille supérieure ou égale à 10 cm nommées classe 2.
- 3) La totalité des plantules appartenant à des espèces différentes d'*A. borbonica*.

Le nombre de plantules au m<sup>2</sup> sous la canopée est défini par le nombre de plantules total / surface de la canopée.

**Analyses des données :** L'ensemble des tests statistiques ont été menés sous SAS (2001).

**Nous avons utilisé des tests de Student pour :** (1) La comparaison du nombre de plantules d'*A. borbonica* en fonction de la classe de taille (test de la différence nombre de plantules de classe 1 - nombre de plantules de classe 2). (2) La comparaison du nombre total de plantules d'*A. borbonica* et d'autres espèces (test de la différence nombre total de plantules d'*A. borbonica* - nombre de plantules d'autres espèces).

**Nous avons utilisé des ANOVA (Proc GLM) pour tester :**

Dans un premier temps, l'effet sexe, population et leur interaction comme effets fixes sur le nombre de plantules d'*A. borbonica* et autres espèces au m<sup>2</sup> sous les individus d'*A. borbonica* adultes.

Puis dans un second temps, l'effet espèce, population et leur interaction comme effets fixes sur le nombre de plantules d'*A. borbonica* et autres espèces au m<sup>2</sup> sous les individus d'*A. borbonica* et d'*A. salicifolia* adultes.

**Nous avons effectué des tests de corrélations de Pearson :**

Sur les variables nombre total de fruits, nombre total de plantules d'*A. borbonica* et nombre de plantules d'autres espèces.

**Tableau II.1 :** Fruits produits sous filets insect-proof et en pollinisation libre chez les morphes pollinifères (P) et femelles (F) dans la population de MAL.

| Individu                            | Morphe | Sous filet      |                 |               | Hors filet      |                 |               | Fruit set*<br>sous filet /<br>Fruit set*<br>hors filet |
|-------------------------------------|--------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------|--------------------------------------------------------|
|                                     |        | Total<br>fleurs | Total<br>fruits | Fruit<br>set* | Total<br>fleurs | Total<br>fruits | Fruit<br>set* |                                                        |
| 1                                   | P      | 328             | 0               | 0             | 163             | 68              | 0.417         | 0                                                      |
| 2                                   | P      | 349             | 5               | 0.014         | 129             | 61              | 0.472         | 0.030                                                  |
| 3                                   | P      | 170             | 10              | 0.058         | 196             | 23              | 0.117         | 0.245                                                  |
| 4                                   | P      | 403             | 29              | 0.072         | 210             | 21              | 0.100         | 0.719                                                  |
| 5                                   | P      | 232             | 1               | 0.004         | 177             | 1               | 0.005         | 0.762                                                  |
| 6                                   | P      | 214             | 0               | 0             | 175             | 0               | 0             | 0                                                      |
| 7                                   | P      | 296             | 0               | 0             | 122             | 31              | 0.254         | 0                                                      |
| 8                                   | P      | 400             | 9               | 0.022         | 129             | 47              | 0.364         | 0.061                                                  |
| 9                                   | P      | 443             | 9               | 0.020         | 131             | 51              | 0.389         | 0.052                                                  |
| 10                                  | P      | 402             | 17              | 0.042         | 196             | 49              | 0.250         | 0.170                                                  |
| <b>Total morphe<br/>pollinifère</b> |        | <b>3237</b>     | <b>80</b>       | <b>0.024</b>  | <b>1628</b>     | <b>352</b>      | <b>0.216</b>  | <b>0.114</b>                                           |
| 1                                   | F      | 144             | 0               | 0             | 97              | 66              | 0.680         | 0                                                      |
| 2                                   | F      | 262             | 0               | 0             | 128             | 100             | 0.781         | 0                                                      |
| 3                                   | F      | 325             | 0               | 0             | 158             | 126             | 0.797         | 0                                                      |
| 4                                   | F      | 184             | 0               | 0             | 169             | 111             | 0.656         | 0                                                      |
| <b>Total femelle</b>                |        | <b>915</b>      | <b>0</b>        | <b>0</b>      | <b>552</b>      | <b>403</b>      | <b>0.73</b>   | <b>0</b>                                               |

Fruit set = ratio nombre de fruits / nombre de fleurs

**Tableau II.2 :** Nombre moyen de plantules d' *Antirhea borbonica* et autres espèces au m<sup>2</sup> sous les morphes pollinifères (P) et femelles (F) d' *Antirhea borbonica* et sous les individus d' *Agauria salicifolia* (A. s) dans les populations de C43b et MAL.

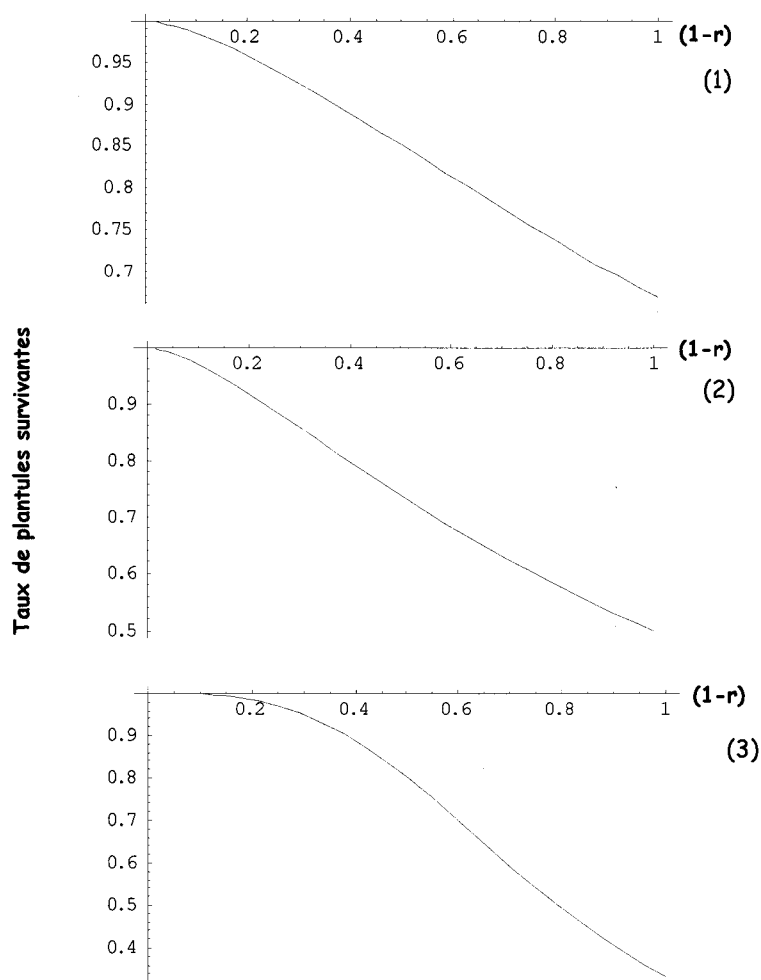
|                                                     |           | C43b    |         |         | MAL     |         |         |
|-----------------------------------------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                                     |           | P       | F       | A. s    | P       | F       | A. s    |
| Plantules<br>d' <i>Antirhea</i><br><i>borbonica</i> | Classe 1  | 12.62   | 66.93   | 14.15   | 1.28    | 2.03    | 0.47    |
|                                                     | (< 10 cm) | (7.54)  | (41.68) | (10.09) | (1.73)  | (2.32)  | (0.29)  |
|                                                     | Classe 2  | 1.24    | 2.96    | 7.59    | 0.57    | 0.73    | 0.14    |
|                                                     | (≥ 10 cm) | (1.72)  | (2.00)  | (6.54)  | (0.62)  | (0.97)  | (0.16)  |
|                                                     | Toutes    | 13.86   | 69.89   | 21.74   | 1.85    | 2.76    | 0.61    |
| classes                                             |           | (7.21)  | (43.35) | (13.94) | (2.14)  | (2.69)  | (0.26)  |
| Plantules<br>autres<br>espèces                      |           | 53.04   | 104.28  | 44.04   | 20.88   | 29.16   | 16      |
|                                                     |           | (42.03) | (53.93) | (13.80) | (20.04) | (31.60) | (14.48) |

(erreur standard)

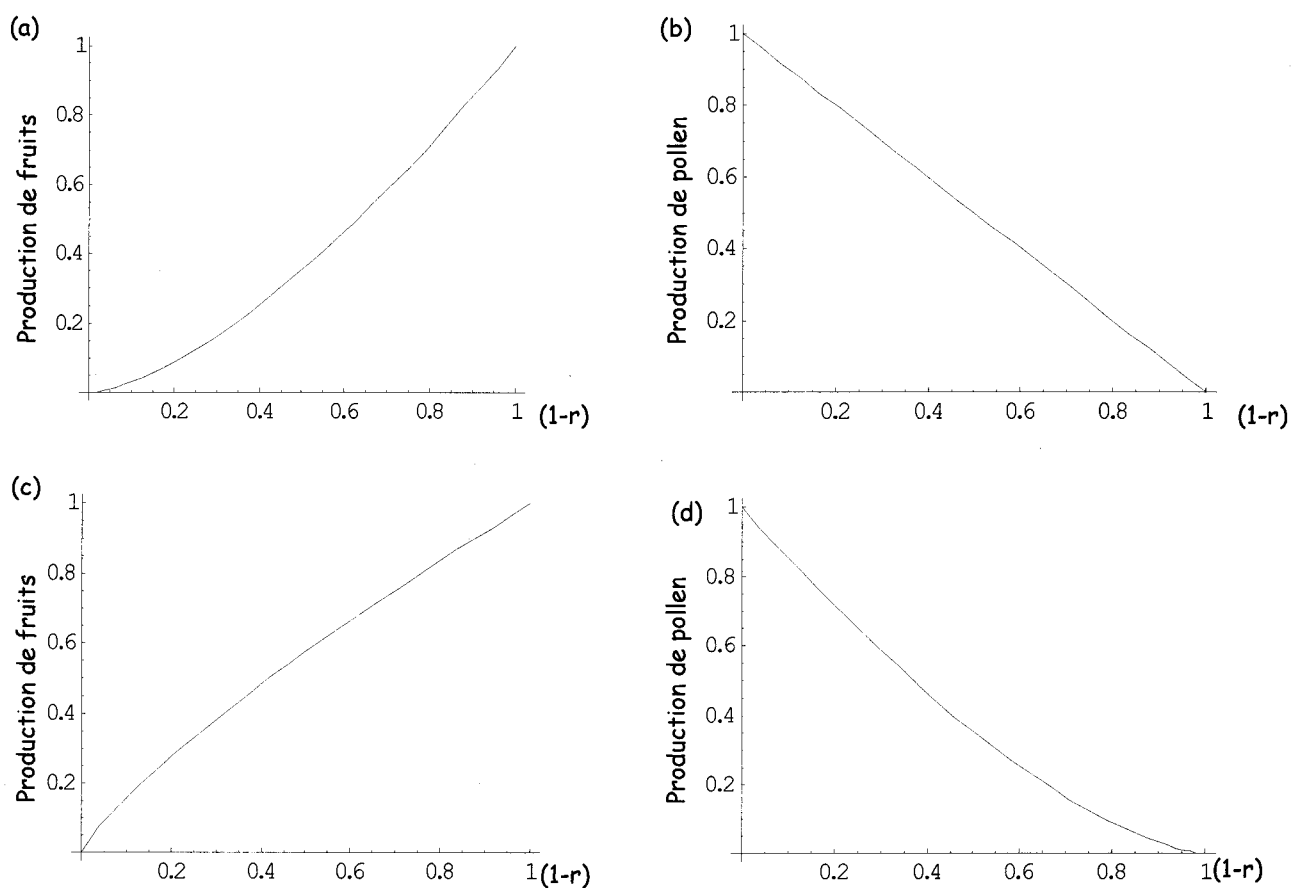
**Tableau II.3 :** Différentes conditions étudiées pour l'effet des ressources et survie des plantules densité-dépendante sur l'évolution du système de reproduction.

|                                                                | Autofécondation | Autofécondation |
|----------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Pas d'auto-fécondation possible                                | $(1-t) = 0.5$   | $(1-t) = 0.9$   |
| Dépression de consanguinité $d = 0.7$                          |                 |                 |
| Survie des plantules :                                         |                 |                 |
| Non densité-dépendante : $a = 0$ et $b = 0$                    |                 |                 |
| Densité-dépendante variable* : - faible : $a = 0.5$ et $b = 1$ |                 |                 |
| - moyenne $a = 1$ et $b = 1$                                   |                 |                 |
| - forte $a = 2$ et $b = 2$                                     |                 |                 |
| Variation du niveau de ressource : $0.5 \leq R \leq 4$         |                 |                 |

\*Courbe de survie des plantules densité-dépendante Figure II.1



**Figure II.1 :** Survie des plantules en fonction de l'investissement femelle (1-r) pour R = 1, (1) a = 0.5 et b = 1; (2) a = 1 et b = 1; (3) a = 2 et b = 2.



**Figure II.2 :** Pour  $R = 1$ ,  $K_1 = 1.5$ ,  $K_2 = 1$ ,  $s_0 = 1$ ,  $a = 0$ ,  $b = 0$ ,  $t = 1$ ,  $d = 0$  (a) Production de fruits en fonction de l'investissement dans la fonction femelle  $(1-r)$  avec la fonction Fruit  $(r) = [R (1-r)]^{k_1}$  ; (b) Production de pollen en fonction de l'investissement dans la fonction femelle  $(1-r)$  avec la fonction Pollen  $(r) = (Rr)^{k_2}$ . Pour  $R = 1$ ,  $K_1 = 0.8$ ,  $K_2 = 1.5$ ,  $s_0 = 1$ ,  $a = 0$ ,  $b = 0$ ,  $t = 1$ ,  $d = 0$  : (c) Production de fruits en fonction de l'investissement dans la fonction femelle  $(1-r)$  avec la fonction Fruit  $(r) = [R (1-r)]^{k_1}$  ; (d) Production de pollen en fonction de l'investissement dans la fonction femelle  $(1-r)$  avec la fonction Pollen  $(r) = (Rr)^{k_2}$ .

## **CHAPITRE III :**

### **STRUCTURATION GENETIQUE DANS UNE SUCCESSION PRIMAIRE**

## Préambule

Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude ont été mis au point durant ma deuxième année de thèse. L'identification de ces locus a fait l'objet d'une primer note, "Isolation of ten polymorphic microsatellite loci from *Antirhea borbonica* (*Rubiaceae*)" in press dans *Molecular Ecology Notes* (annexe 4).

Par ailleurs, ce chapitre correspond à l'article "Spatial structure of genetic variation and primary succession in the pioneer woody species *Antirhea borbonica* on La Réunion" soumis à *Molecular Ecology*. Les plans d'échantillonnage, les analyses des données moléculaires ainsi que la totalité des résultats sont détaillés dans cet article (annexe 5).

Avant d'entamer ce chapitre, j'aimerais insister sur le souci que nous avons de couvrir une grande partie du génome afin d'acquérir plus d'informations. C'est pour cette raison, que nous avons utilisé deux types de marqueurs. Les microsatellites généralement très polymorphes et surtout codominants, et les AFLP qui, malgré les homoplasies dont ils peuvent faire l'objet et leur caractère dominant, couvrent une grande partie du génome.

## I. INTRODUCTION

Pour les espèces évoluant en milieu perturbé et fragmenté, la colonisation et donc la migration sont des processus indispensables à leur survie. Lorsque la colonisation se fait à longue distance et de façon ponctuelle, comme la colonisation d'îles ou lorsqu'elle se fait à plus petite échelle mais de façon récurrente, l'impact de sa dynamique sur la structuration génétique paraît être fondamentale (Husband & Barrett 1996).

Un des paramètres conditionnant cet impact de la dynamique de colonisation réside dans la fondation des populations. La structure génétique va dépendre fortement des caractéristiques des groupes fondateurs. De l'origine, du nombre et de l'apparement des individus. Slatkin (1977) fait part de deux situations dont les conséquences sur la structuration génétique sont fondamentalement différentes : le "*propagule pool model*" qui induit une forte différenciation des populations et le "*migrant pool model*" qui génère une faible différenciation entre les populations. Nous avons vu en introduction de cette thèse que l'étude des impacts de la colonisation dans un système de métapopulation avait fait l'objet d'un grand nombre d'études, mais peu prennent en compte les processus écologiques intervenant dans une succession primaire.

*Antirhea borbonica*, pionnier, des coulées de lave et persistant dans les stades tardifs de la succession présente une opportunité de mener ce genre d'étude. Dans le Grand Brûlé les populations sont régulièrement perturbées et se fondent les une à partir des autres. L'espèce persiste au cours du temps puisque nous la retrouvons sur des vieux stades successionnels dans le grand Brûlé et aussi dans des habitats plus stables, parce que non soumis aux perturbations volcaniques. Les populations d'*A. borbonica* se structurent en âge. Dans ce chapitre, nous déterminerons la variabilité génétique de l'espèce et sa structuration dans l'espace.

Nous nous intéresserons au degré de différenciation des populations en considérant leur âge et leur localisation, élément majeur nous permettant de mieux comprendre l'effet des événements de fondations. Les jeunes populations sont elles



plus différenciées que les vieilles dans le Grand Brûlé ? Nous essaierons de définir la structuration génétique de l'espèce en tenant compte du patron de variation du genre sexuel du morphe pollinifère. Le coefficient de consanguinité ( $F_{is}$ ) est-il plus important dans les vieilles populations que dans les jeunes populations ? Nous essaierons de comprendre l'impact de la colonisation sur la structure génétique d'*A. borbonica* en interprétant nos résultats dans le cadre des successions primaires et des processus écologiques qui y sont associés. Cette étude sera menée à l'aide de marqueurs microsatellites (annexe 4) et AFLP (annexe 5).

## II. METHODES ET RESULTATS

Dans ce paragraphe, nous ne détaillerons ni les méthodes utilisées pour le génotypage et l'analyse des données moléculaires, ni la totalité des résultats (Cf. annexes 4 et 5). Nous exposerons, de façon brève, le plan d'échantillonnage et quelques résultats puis discuterons les points importants.

### Plan d'échantillonnage et génotypage

Nous avons échantillonné des individus dans 13 populations de la Réunion, dont 9 dans le Grand Brûlé (6 jeunes : C76, C61, C43a, C43b, C43c, C31 et 3 vieilles : C19, KP1, KP2) et 4 vieilles (MAL, CIL, DOD, BEB) hors enclos du Grand Brûlé, qui diffèrent par leurs conditions écologiques et spatialement très distantes (Tab. i.1). De plus, nous avons échantillonné une vieille population de l'île Maurice (MAU).

Au total 366 individus adultes à raison de 21-31 par population (Tab. III.1) ont été génotypés à l'aide de 7\* locus microsatellites (annexe 4). Parmi ces individus adultes, 226 ont aussi été génotypés à l'aide de 155\*\* marqueurs AFLP (9 à 23 par population-Tab. III.1).

De plus, sur la population de C43b, 177 plantules échantillonnées au hasard ont été génotypées avec les mêmes 7 locus microsatellites.

Enfin, compte tenu que le nombre de chromosomes est inconnu pour toutes les

\* le déséquilibre de liaison testé dans chaque population et pour chaque paire de locus en utilisant 1000 permutations avec Genetix (Version 4.04, Belkhir *et al.* 2001) montre 12 cas de déséquilibre sur 294 testés, ce qui est moins qu'attendu par hasard au risque de 5% (14.7)

\*\* L'analyse AFLP a révélé 184 pics polymorphes et exploitables. Après avoir testé l'indépendance des locus à l'aide du logiciel DDM (Berthier logiciel non publié), nous avons retiré 29 locus liés au seuil de 5%, donc l'analyse a été conduite avec 155 locus polymorphes.

espèces du genre *Antirhea*, Régine Verlaque a entrepris la caryologie de l'espèce *borbonica* à partir de 7 individus (2 de la population C43b, 3 de KP1 et 2 de MAL) en utilisant la méthode décrite dans Verlaque *et al.* (2002). Cette étude a permis de montrer que tous les individus analysés d'*A. borbonica* possédaient le même nombre de chromosomes  $2n = 4x = 44$ . Nous n'avons pas la certitude que cette espèce soit allotétraploïde car la petite taille des chromosomes ( $0.5 \mu\text{m}$ ) n'a pas permis d'établir le caryotype, mais le génotypage à l'aide des microsatellites nous conforte dans cette idée (jamais plus de deux allèles observés à un locus donné chez un individu).

#### Diversité génétique intra-population

Chez les individus adultes, le nombre moyen d'allèles par locus est de 7.14 sur l'ensemble des populations et de 3.15 par population (Tab. III.1). Le taux d'hétérozygotie attendu varie entre 0.339 et 0.481 avec les marqueurs microsatellites et entre 0.168 et 0.276 pour les locus AFLP et l'indice de Shannon varie de 0.2750 à 0.4268 (Tab. III.1). Les valeurs de  $F_{is}$  sont élevées et significatives dans chacune des populations traduisant un écart à l'équilibre d'Hardy Weinberg pour chacune d'entre elles (Tab. III.1). Il est important de noter que les valeurs de  $F_{is}$  ne sont pas corrélées avec l'âge des populations ( $F_{is}$  varie de 0.16 à 0.42 dans les jeunes populations et de 0.19 à 0.49 dans les vieilles populations).

Chez les plantules de la population C43b, le nombre moyen d'allèles par locus est de 4.57 et comme pour la génération des adultes un écart à l'équilibre d'Hardy Weinberg est constaté ( $F_{is} = 0.4052$  et  $P < 0.0001$ ). La valeur supérieure du  $F_{is}$  chez les plantules par rapport aux individus adultes peut être le résultat d'un effet Wahlund temporel dû à l'échantillonnage de plantules issues de différentes années de reproduction.

#### Différenciation des populations (comparaison par paire de populations, Tab. III.2)

Le degré de différenciation de l'ensemble des populations estimé à partir des marqueurs microsatellites est  $F_{st} = 0.1$  ( $P < 0.001$ ) et  $F_{st} = 0.19$  ( $P < 0.001$ ) avec les marqueurs AFLP. Lorsque la différenciation est mesurée en retirant la population de

Maurice les valeurs de  $F_{st}$  sur les locus microsatellites et AFLP sont respectivement de 0.09 ( $P < 0.001$ ) et 0.19 ( $P < 0.001$ ). Quand on s'intéresse à la différenciation entre les populations évoluant dans le Grand Brûlé uniquement, on constate une faible valeur de  $F_{st}$  issue des marqueurs microsatellites (0.04) mais cette valeur est significative ( $P < 0.001$ ) et une différenciation plus importante avec les marqueurs AFLP ( $F_{st} = 0.2$ ,  $P < 0.001$ ). Quant aux vieilles populations situées hors du Grand Brûlé, les valeurs de  $F_{st}$  pour les microsatellites et les AFLP sont respectivement de 0.19 ( $P < 0.001$ ) et 0.22 ( $P < 0.001$ ). Dans le Grand Brûlé, la différenciation entre les jeunes stades successionnels\* (microsatellites :  $F_{st} = 0.04$ ,  $P < 0.001$  et AFLP :  $F_{st} = 0.2$ ,  $P < 0.001$ ) n'est pas plus importante que la différenciation entre les stades plus âgés\*\* (microsatellites :  $F_{st} = 0.04$ ,  $P < 0.001$  et AFLP :  $F_{st} = 0.15$ ,  $P < 0.001$ ). Enfin, la différenciation entre les jeunes et les vieux stades successionnels situés dans le Grand Brûlé est faible, et cela aussi bien à partir des microsatellites ( $F_{st} = 0.0052$ ,  $P < 0.05$ ) qu'à partir des données AFLP ( $F_{st} = 0.06$ ,  $P < 0.005$ ). Même si les valeurs de  $F_{st}$  sont un peu plus élevées avec les AFLP, ce qui peut être la conséquence du caractère dominant de ces marqueurs (Isabel *et al.* 1999, Kruvotovskii *et al.* 1999), les patrons de différenciation observés à l'aide des deux types de marqueurs sont à peu près similaires.

#### Isolement par la distance

Premièrement, sur l'ensemble des populations, les tests de Mantel ( $F_{st}$  et distances spatiales) ne traduisent aucun isolement par la distance et cela aussi bien pour les microsatellites que pour les AFLP. De même les régressions multilocus de  $F_{st} / (1 - F_{st})$  ne montrent pas de corrélation avec la distance géographique. Deuxièmement, les autocorrélations spatiales effectuées dans les populations de C76, C43a, C43b, C43c, C19, KP1, MAL montrent que pour une distance donnée, les coefficients d'apparentement de Loiselle *et al.* (1995) entre une paire d'individus peuvent prendre des valeurs variables. C'est-à-dire que deux individus séparés d'une distance X peuvent être génétiquement très différents ou très proches. Cela se manifeste nettement par la forme des nuages de points de la figure III.1. Bien entendu, aucune

\* C76, C61, C43a, C43b, C43c, C31

\*\* C19, KP1, KP2

corrélation négative entre distance séparant les individus et coefficient d'apparentement n'existe dans ces populations.

### Tests d'assignations

Les tests d'assignations ont été conduits en utilisant deux méthodes, la méthode Bayésienne (Rannala & Mountain 1997) et la méthode des Distances (Nei *et al.* 1983) qui contrairement à la première ne fait pas l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy Weinberg (Cornuet *et al.* 1999). Avec la méthode Bayésienne 62.3% (228/366) d'individus adultes sont correctement assignés contre 39.9% (146/366) avec la méthode des Distances (Fig. III.2a). L'assignation des individus adultes non plus dans l'ensemble des populations, mais dans 3 groupes organisés en groupe 1 : toutes les populations situées dans le Grand Brûlé, groupe 2 : toutes les populations situées hors du Grand Brûlé à l'exception de Maurice et groupe 3 : la population de Maurice, montre que 100% des individus sont correctement assignés avec la méthode Bayésienne contre 76.8% avec la méthode des Distances.

L'assignation des plantules échantillonnées dans la population de C43b affiche 47.4% (84/177) d'assignations à C43b avec la méthode Bayésienne contre 35.6% (63/177) avec la méthode des Distances (Fig. III.2b). Aussi bien pour les individus adultes que pour les plantules, les "mauvaises" assignations ne permettent pas d'avoir une idée de la population d'origine en raison d'une égale probabilité d'assignation à plusieurs populations.

### III. DISCUSSION

Cette étude génétique nous a permis de mettre en évidence plusieurs résultats clés pour la compréhension de la dynamique des populations d'*Antirhea borbonica* dans une succession primaire. D'une part, nous observons que les fréquents évènements de colonisation arrivant dans le Grand Brûlé ne semblent pas favoriser la différenciation des populations puisque les jeunes stades ne sont pas plus différenciés entre eux que

ne le sont les plus vieux stades dans le Grand Brûlé. D'autre part, dans chacune des populations les valeurs de  $F_{is}$  sont significativement différentes de zéro et ne sont pas corrélées à l'âge des populations. Ce qui nous conforte dans l'idée que cette espèce est fonctionnellement dioïque (Chapitre I) et que l'autofécondation ne joue pas un rôle important dans la reproduction des morphes pollinifères. Nous discuterons ces résultats à la lumière des processus écologiques associés à la dynamique de colonisation dans une succession primaire.

#### ***Pas de différenciation forte entre les populations nouvellement fondées***

Dans notre étude, les populations d'*A. borbonica* dans le Grand Brûlé, ne montrent pas plus de différenciation lorsqu'elles sont jeunes. Cela implique que les effets de fondation n'entraînent pas de grandes différenciations entre les populations, ce qui pourrait être expliqué par la colonisation multi-sources de coulées nouvellement formées. Les populations de l'enclos du Grand Brûlé ne sont pas très différenciées et la faible distance spatiale de certaines populations de l'enclos pourrait en être la cause. De plus, dans le Grand Brûlé, il existe en effet un faible isolement spatial entre les jeunes coulées et les populations potentiellement sources (Thébaud & Strasberg 1997) et il est probable que la colonisation des coulées se fasse à partir des fragments résiduels les plus proches. Thébaud & Strasberg (1997) puis Prugnolle (1999) montrent que la colonisation des coulées se fait par "vagues" successives des bords de la coulée vers le centre pour la plupart des espèces, y compris pour *A. borbonica* qui est une espèce des plus communes sur milieu ouvert dans le Grand Brûlé (Strasberg 1994).

Dans notre étude les résultats issus des microsatellites et des AFLP ont globalement un patron similaire, même si le degré de différenciation estimé entre les populations du Grand Brûlé est supérieur en AFLP. En effet, la différenciation est faible avec les marqueurs microsatellites et moyenne en AFLP, mais elle est significative dans les deux cas. Soit, comme nous l'avons énoncé plus haut, l'estimation des  $F_{st}$  avec les marqueurs AFLP peut être surestimée à cause du caractère dominant de ces marqueurs, soit cette différenciation est due à un effet de la sélection. Les

marqueurs AFLP couvrant une plus grande partie du génome pourraient être situés à proximité de régions codantes et subir l'effet d'"autostop". Ceci étant dit, la différenciation entre les populations du Grand Brûlé est variable en fonction de la paire de populations considérée. Aussi, si l'on considère (i) que l'origine des individus fondateurs est multi-sources à partir de plusieurs fragments situés en bordure de la coulée, (ii) que la dispersion des individus fondateurs des fragments sources vers la coulée se produit sans trop de limitation, alors, si la structuration initiale de la population persiste avec l'âge on peut s'attendre à ne pas trouver plus de différenciation entre les jeunes populations qu'entre les vieilles. Herrera *et al.* (1994) illustrent pour une espèce de ligneux ornithochore en région méditerranéenne, l'influence de la dynamique de colonisation durant les premiers stades successionnels sur la structuration spatiale à long terme.

Lorsque l'on examine la différenciation entre les très vieux stades successionnels situés hors du Grand Brûlé à La Réunion, on constate que les quatre populations sont bien différenciées. Cette différenciation peut résulter d'un isolement des populations dû à des barrières et des distances géographiques importantes limitant les flux géniques. Les disperseurs et pollinisateurs d'*A. borbonica* sont méconnus, les seuls éléments correspondent à des observations terrain. Un consommateur avéré de fruits d'*A. borbonica* est le " Zoiseau Blanc", il s'agit de *Zosterops borbonicus* et comme les syrphes observées sur les fleurs d'*A. borbonica*, cet oiseau ne parcourt pas de très longues distances, il est plutôt sédentaire. Il est probable que certaines espèces de petits papillons de nuit généralistes participent à la pollinisation d'*A. borbonica*, mais leur comportement et leur déplacement sont inconnus. La différenciation, outre le fait qu'elle pourrait résulter de cet isolement géographique et de périodes de floraison décalées dans le temps entre ces populations (obs. pers), pourrait être causée par des effets de dérive génétique répétés dus à la fréquence des phénomènes cycloniques à La Réunion.

Enfin, un dernier résultat intéressant concernant la différenciation des populations, se rapporte à la population de Maurice qui est, certes différenciée des populations de La Réunion, mais pas beaucoup plus que ne le sont les populations

réunionnaises entre elles. Ceci, nous permet de faire l'hypothèse que l'île Maurice pourrait être la source de colonisation de l'île de La Réunion pour *A. borbonica* et que l'effet de fondation n'est pas très fort même sur de longues distances, peut être des phénomènes de colonisations répétés (fonction de l'avifaune de l'époque) en sont la cause ?

### *Pourquoi des $F_{is}$ élevés dans toutes les populations ?*

Un autre fait marquant de notre étude concerne les valeurs de  $F_{is}$  qui sont significativement différentes de zéro dans toutes les populations étudiées. Des valeurs de  $F_{is}$  importantes peuvent être la conséquence d'un fort taux d'autofécondation. Mais bien que la capacité des morphes pollinifères à fructifier est vérifiée chez *A. borbonica*, il est peu raisonnable de penser que les valeurs de  $F_{is}$  pourraient être dues à un taux d'autofécondation élevé chez cette espèce. En effet, plusieurs points nous permettent d'affirmer cela : (i) les valeurs de  $F_{is}$  ne sont pas corrélées avec l'âge du stade successional, or la fructification du morphe pollinifère est supérieure dans les vieux stades relativement aux jeunes; (ii) les graines issues des morphes pollinifères possèdent une valeur sélective très faible, et enfin (iii) les sexe-ratios sont équilibrés dans presque la totalité des populations. Cet ensemble de résultats indique que la contribution des morphes pollinifères via leur fonction femelle semble négligeable et que l'explication des valeurs de  $F_{is}$  ne se trouve donc pas dans un taux d'autofécondation liés à l'expression d'une fonction femelle chez ce morphe.

En revanche, les valeurs de  $F_{is}$  pourraient être liées à une structuration spatiale intra-population induisant un effet Walhund associé à des croisement entre apparentés. En effet, dans plusieurs populations d'*A. borbonica* une agrégation spatiale d'individus a été rapporté. Par exemple, dans 3 sur 4 populations de la coulée de 1943 (Prugnolle 1999, Litrico 2001), dans 1 sur 2 fragments de forêt dans le Grand Brûlé (Litrico 2001) et dans 1 sur 3 parcelles situées dans la forêt de MAL (J. Gilles, F. Prugnolle & D. Strasberg données non publiées). Cette agrégation spatiale suggère que chaque population, qu'elle soit jeune ou vieille, dans ou hors enclos, correspond à un ensemble de "taches" plus ou moins dense. Une telle agrégation, s'il s'agit en plus

d'individus apparentés pourrait contribuer à des fortes valeurs de  $F_{is}$ . Les résultats des tests d'autocorrélations spatiales (pour une distance donnée les individus peuvent être très proches ou très éloignés génétiquement) et le pourcentage de plantules assignées à C43b appuient cette hypothèse d'agrégation spatiale. Plusieurs processus écologiques associés aux successions primaires pourraient créer une telle structuration intra-population.

Tout d'abord, une dissémination limitée vers et dans les premiers stades de la succession primaire pourrait avoir une influence très forte sur la colonisation (Del Moral 1993). Sur une coulée donnée, le nombre d'individus d'*A. borbonica* décroît lorsque l'on se dirige du bord de la coulée vers le centre (Thébaud & Strasberg 1997, Prugnolle 1999) traduisant une limitation temporelle de dispersion à partir de la source avec la distance.

Ensuite, la dispersion à partir de l'individu mère décroît généralement avec la distance et comme chez la plus part des espèces fonctionnellement dioïques il existe chez *A. borbonica* (Chapitre II) une nucléation des plantules autour du pied mère (dans les jeunes populations). Ce phénomène associé aux effets perchoirs (Debussche *et al.* 1985 1985), favorise la formation de patch d'individus, qui plus est d'individus apparentés. L'établissement de groupes d'individus apparentés chez des espèces pionnières où les femelles unisexuées sont les principaux producteurs de graines a été suggéré par d'autres études (Manicacci *et al.* 1996, Tarayre *et al.* 1997, Giles *et al.* 1998).

Puis, les premiers stades de la succession constituent un environnement stressant, seuls quelques sites pourraient être favorables à l'établissement d'individus. Sur les coulées de lave, il est facile de constater que les individus d'*A. borbonica* s'installent dans des fissures et des dépressions qui autorisent un certain taux d'humidité et l'accumulation de quelques nutriments. Or, le nombre de fissures et de dépressions sur les coulées est relativement réduit (Thébaud & Strasberg 1997) ce qui limiterait l'installation des individus à certaines surfaces. D'ailleurs, Strasberg (1994) fait état d'une distribution agrégée des espèces ornithochores sur les coulées du Grand Brûlé dans les premiers stades de colonisation.



Enfin, les phénomènes de facilitation ont été décrits comme primordiaux pour la colonisation et le développement des successions primaires (Connell & Slatyer 1977; Callaway *et al.* 1990, Bertness & Callaway 1994), ce qui pourraient favoriser aussi l'agrégation des individus. L'effet plante "nurse", semble nécessaire sur les premiers stades de la succession, la litière et les conditions provoquées par la présence d'un individu favoriseraient l'établissement des plantules en dessous, la compétition entre individus étant largement compensée par l'effet plante nurse (Callaway & Walker 1997).

En conclusion, les processus écologiques liés aux successions primaires et le système de reproduction pourraient jouer un rôle important dans la dynamique de colonisation des espèces, favorisant les structurations à petites échelles spatiales. Il est aussi important de noter que cette étude suggère comment, chez les espèces pérennes, les phénomènes agissant sur les premiers stades de la succession peuvent avoir des effets à long terme et conditionner la structuration des vieux stades successionnels. Chez *A. borbonica*, il n'y a quasiment aucune régénération en milieu fermé, et donc les premiers stades sont primordiaux. Plusieurs perspectives émanent de cette étude, il semble intéressant de (i) définir si la structuration génétique observée à l'aide de marqueurs cytoplasmiques rejoint les hypothèses que nous posons et (ii) d'essayer de mettre en évidence de façon fine une structuration intra population sur plusieurs jeunes coulées et fragments de forêt.

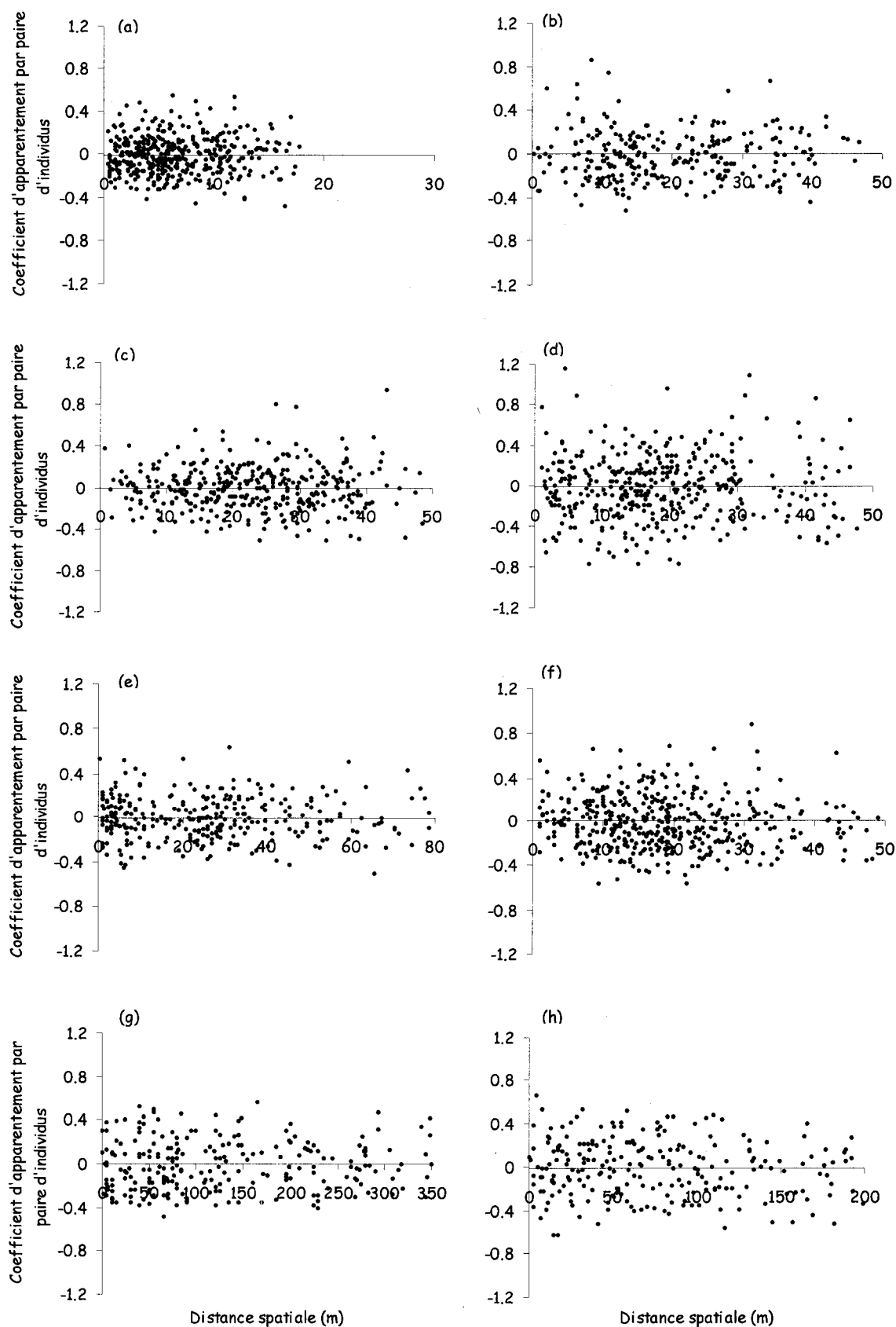
**Table III.1** : Nombre moyen d'allèles par locus ( $N_b$ ), Hétérozygotie attendue ( $H_e$ ), Hétérozygotie observée ( $H_o$ ), Indice de fixation  $F_{is}$ , Pourcentage de locus polymorphe en AFLP ( $N_b$ ) et Indice de diversité de Shannon ( $I_s$ ) calculés à partir d'individus adultes dans des populations d' *Antirhea barbonica*.

| Population | Date de la<br>coulée de<br>lave | Stade<br>successionnel | LOCUS MICROSATELLITES |       |                 |        |          | MARQUEURS AFLP |       |                 |                 |  |
|------------|---------------------------------|------------------------|-----------------------|-------|-----------------|--------|----------|----------------|-------|-----------------|-----------------|--|
|            |                                 |                        | Effectif              | $N_b$ | $H_e$           | $H_o$  | $F_{is}$ | Effectif       | $N_b$ | $H_e$           | $I_s$           |  |
| C76        | 1976                            | jeune                  | 29                    | 3.85  | 0.4809 (0.2386) | 0.3634 | 0.26***  | 19             | 88.39 | 0.2276 (0.1668) | 0.3602 (0.2238) |  |
| C61        | 1961                            | jeune                  | 29                    | 3.42  | 0.4452 (0.1678) | 0.3797 | 0.16***  | 19             | 94.84 | 0.2763 (0.1621) | 0.4268 (0.2100) |  |
| C43a       | 1943                            | jeune                  | 23                    | 4.00  | 0.4600 (0.3694) | 0.2902 | 0.38***  | 19             | 85.81 | 0.2563 (0.1645) | 0.3969 (0.2252) |  |
| C43b       | 1943                            | jeune                  | 26                    | 3.57  | 0.4251 (0.1842) | 0.3387 | 0.22***  | 12             | 87.74 | 0.2464 (0.1601) | 0.3865 (0.2166) |  |
| C43c       | 1943                            | jeune                  | 28                    | 2.20  | 0.3396 (0.2310) | 0.2021 | 0.42***  | 14             | 72.90 | 0.1677 (0.1512) | 0.2750 (0.2197) |  |
| C31        | 1931                            | jeune                  | 21                    | 2.83  | 0.4789 (0.1838) | 0.3066 | 0.38***  | 11             | 74.84 | 0.2143 (0.1726) | 0.3351 (0.2437) |  |
| C19        | 100 ans                         | vieux                  | 25                    | 2.85  | 0.4525 (0.1971) | 0.3312 | 0.28***  | 15             | 87.10 | 0.2134 (0.1448) | 0.3461 (0.2011) |  |
| KP1        | 100-300 ans                     | vieux                  | 30                    | 3.14  | 0.4170 (0.1960) | 0.2805 | 0.34***  | 16             | 88.39 | 0.2319 (0.1516) | 0.3698 (0.2066) |  |
| KP2        | 100-300 ans                     | vieux                  | 30                    | 3.42  | 0.4103 (0.2293) | 0.3362 | 0.19***  | 20             | 91.61 | 0.2449 (0.1590) | 0.3858 (0.2125) |  |
| MAL        | ~ 500 ans                       | vieux                  | 22                    | 3.14  | 0.4558 (0.2382) | 0.2619 | 0.44***  | 9              | 74.84 | 0.2199 (0.1744) | 0.3424 (0.2448) |  |
| CIL        | > 500 ans                       | vieux                  | 22                    | 2.71  | 0.4085 (0.2625) | 0.3117 | 0.25***  | 13             | 87.74 | 0.2154 (0.1555) | 0.3468 (0.2108) |  |
| DOD        | > 500 ans                       | vieux                  | 24                    | 3.14  | 0.4171 (0.1941) | 0.2174 | 0.49***  | 16             | 90.32 | 0.2517 (0.1485) | 0.3971 (0.2004) |  |
| BEB        | > 500 ans                       | vieux                  | 26                    | 2.57  | 0.3703 (0.1846) | 0.2560 | 0.32***  | 23             | 85.16 | 0.2404 (0.1648) | 0.3760 (0.2260) |  |
| MAU        | > 500 ans                       | vieux                  | 31                    | 3.28  | 0.3792 (0.2119) | 0.3024 | 0.21***  | 20             | 90.32 | 0.2720 (0.1666) | 0.4179 (0.2231) |  |

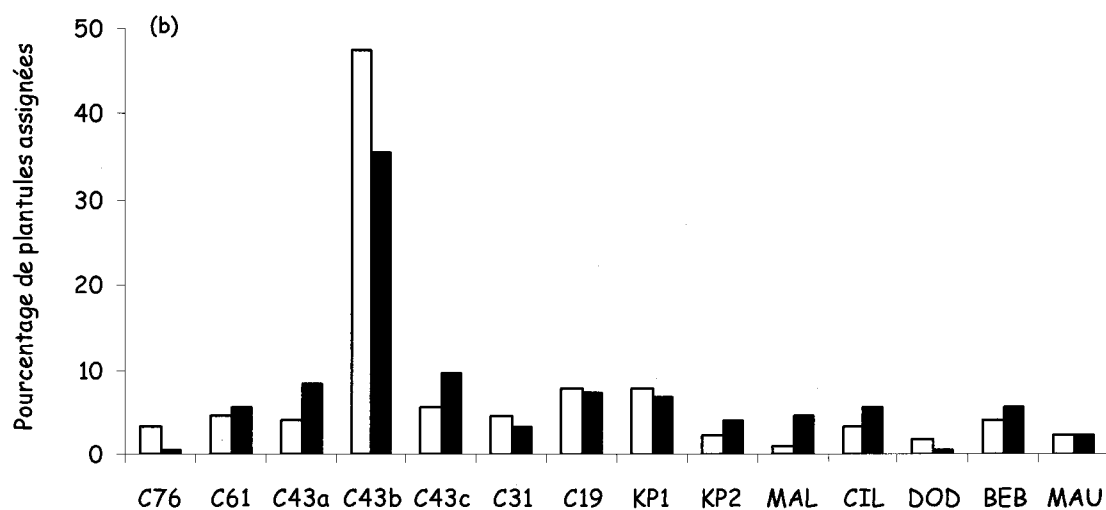
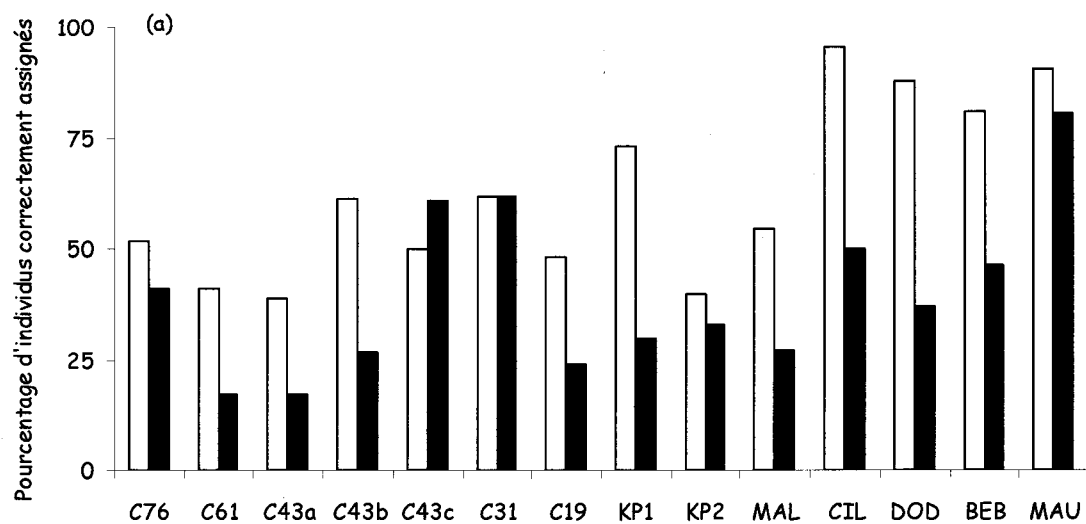
\*\*\*  $P < 0.001$

**Table III.2** : Comparaison par paire des valeurs de  $F_{ST}$  values (valeurs non significativement différentes de 0 et italiques) estimées sur les 7 locus microsatellites (matrice supérieure) et sur 155 marqueurs AFLP (matrice inférieure), à partir des individus adultes des populations d' *Antirhea borbonica* à La Réunion et Maurice.

| Population | Date de la<br>coulée de<br>lave | Stade<br>successionnel | C76   | C61   | C43a  | C43b  | C43c  | C31   | C19   | KP1   | KP2    | MAL   | CTL   | DOD   | BEB   | MAU   |
|------------|---------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C76        | 1976                            | jeune                  | -     | 0.007 | 0.037 | 0.012 | 0.043 | 0.101 | 0.008 | 0.050 | 0.022  | 0.090 | 0.086 | 0.134 | 0.071 | 0.138 |
| C61        | 1961                            | jeune                  | 0.018 | -     | 0.020 | 0.019 | 0.062 | 0.096 | 0.005 | 0.049 | -0.002 | 0.112 | 0.082 | 0.127 | 0.122 | 0.148 |
| C43a       | 1943                            | jeune                  | 0.105 | 0.066 | -     | 0.035 | 0.055 | 0.095 | 0.007 | 0.052 | 0.007  | 0.067 | 0.052 | 0.119 | 0.041 | 0.074 |
| C43b       | 1943                            | jeune                  | 0.106 | 0.065 | 0.066 | -     | 0.001 | 0.101 | 0.007 | 0.058 | 0.029  | 0.076 | 0.105 | 0.148 | 0.061 | 0.152 |
| C43c       | 1943                            | jeune                  | 0.292 | 0.218 | 0.148 | 0.139 | -     | 0.167 | 0.043 | 0.050 | 0.046  | 0.118 | 0.076 | 0.116 | 0.033 | 0.166 |
| C31        | 1931                            | jeune                  | 0.397 | 0.324 | 0.322 | 0.296 | 0.382 | -     | 0.091 | 0.064 | 0.103  | 0.022 | 0.144 | 0.213 | 0.124 | 0.127 |
| C19        | 100-300 ans                     | vieux                  | 0.220 | 0.152 | 0.078 | 0.093 | 0.045 | 0.327 | -     | 0.051 | 0.012  | 0.088 | 0.090 | 0.129 | 0.072 | 0.121 |
| KP1        | 100-300 ans                     | vieux                  | 0.292 | 0.217 | 0.018 | 0.153 | 0.182 | 0.114 | 0.145 | -     | 0.052  | 0.129 | 0.116 | 0.174 | 0.132 | 0.173 |
| KP2        | 100-300 ans                     | vieux                  | 0.328 | 0.250 | 0.244 | 0.211 | 0.287 | 0.034 | 0.242 | 0.045 | -      | 0.130 | 0.089 | 0.127 | 0.140 | 0.164 |
| MAL        | ~ 500 ans                       | vieux                  | 0.084 | 0.068 | 0.081 | 0.060 | 0.234 | 0.361 | 0.175 | 0.235 | 0.283  | -     | 0.217 | 0.228 | 0.102 | 0.108 |
| CTL        | > 500 ans                       | vieux                  | 0.106 | 0.068 | 0.048 | 0.028 | 0.140 | 0.326 | 0.092 | 0.175 | 0.240  | 0.048 | -     | 0.181 | 0.180 | 0.245 |
| DOD        | > 500 ans                       | vieux                  | 0.144 | 0.095 | 0.054 | 0.036 | 0.061 | 0.309 | 0.042 | 0.134 | 0.220  | 0.097 | 0.029 | -     | 0.248 | 0.276 |
| BEB        | > 500 ans                       | vieux                  | 0.385 | 0.306 | 0.315 | 0.289 | 0.383 | 0.052 | 0.328 | 0.132 | 0.047  | 0.344 | 0.324 | 0.313 | -     | 0.286 |
| MAU        | > 500 ans                       | vieux                  | 0.103 | 0.070 | 0.080 | 0.032 | 0.223 | 0.318 | 0.151 | 0.203 | 0.241  | 0.047 | 0.075 | 0.960 | 0.306 | -     |



**Figure III.1** : Autocorrélations spatiales dans 8 populations d'*Antirhea borbonica* à La Réunion. (a) C76, (b) C43a, (c) C43b, (d) C43c, (e) C19, (f) KP1, (g) MAL, (h) BEB.



**Figure III.2 :** Pourcentages (a) individus adultes correctement assignés dans chaque population et (b) pourcentage de plantules assignées. Les barres blanches correspondent à la méthode Bayésienne et les barres noires à la méthode des Distances.

**CONCLUSIONS  
ET  
PERSPECTIVES**

La thématique de cette thèse concerne les conséquences des perturbations, c'est-à-dire l'impact des phénomènes de destruction et de fragmentation des habitats, sur la dynamique des populations végétales. Ces conséquences sont abordées sous deux angles : (i) la plasticité du genre sexuel et son caractère adaptatif et (ii) l'influence des processus écologiques liés à la colonisation, dans le cadre de succession primaire, sur la structure génétique.

Les objectifs étaient,

- (i) de quantifier la variation du genre sexuel et d'en déterminer les causes,
- (ii) de définir sous quelles pressions de sélection une plasticité du genre sexuel pouvait traduire une adaptation lors de changements de milieu dans une succession primaire,
- (iii) d'évaluer les conséquences génétiques de la reproduction et de la dynamique de colonisation sous l'influence des processus liés à la succession primaire.

Dans cette partie, nous discuterons l'apport nouveau et les perspectives des résultats importants de cette thèse, en insistant sur l'articulation des différents chapitres entre eux.

*Anthirea borbonica* est un arbre pionnier des coulées de lave dont les populations évoluent en métapopulation dans un milieu particulièrement perturbé. Cette espèce colonise les milieux ouverts et persiste sur des stades tardifs de la succession. Alors que sous l'effet de l'assurance à la reproduction ou du "*seed shadow handicap*", certains auteurs prédisent un avantage à l'hermaphrodisme lors de la colonisation, notre étude montre un patron contradictoire à ces prédictions. Chez *A. borbonica*, nous faisons état de l'unisexualité des individus sur les jeunes stades de la succession et d'une augmentation de la fonction femelle des morphes pollinifères dans les stades plus anciens. Le caractère ligneux et le grand nombre de sources potentielles à la colonisation des nouveaux sites aux alentours, font que la probabilité de trouver un partenaire sexuel lors de la colonisation n'est pas une forte pression de sélection chez cette espèce. Les résultats de l'étude génétique montrent un faible effet de

fondation attestant d'une fondation multi sources lors de la colonisation. D'autre part, l'hypothèse du "*seed shadow handicap*" pour l'avantage à colonisation et à l'expansion de populations hermaphrodites sur les sites récemment colonisés n'est pas en adéquation, ni avec la capacité de fructification des morphes pollinifères d'*A. borbonica* (le faible niveau de ressources des nouveaux sites ne permet pas une production de fruits conséquente des morphes pollinifères), ni avec les processus liés aux successions primaires. En effet, il y a globalement trois possibilités de structure spatiale des populations naturelles, aléatoire, homogène et agrégée. Mais sur les premiers stades de successions primaires, en raison des phénomènes de facilitation et de la présence réduite de microsites favorables, seule l'agrégation semble possible. Ainsi dans les premiers stades successionnels, l'agrégation via la facilitation pourrait avoir des bénéfices non négligeables pour l'installation des individus. Il pourrait exister un équilibre entre les bénéfices liés à la facilitation et les coûts provenant de la compétition, cet équilibre serait variable le long de la succession (Callaway 1995, Rousset & Lepart 2000).

La partie théorique de cette étude bien que préliminaire, conforte les prédictions d'autres études telles que celles de Charvov *et al.* (1976) et Charnov (1982) qui énoncent une augmentation de l'hermaphrodisme avec les ressources. Dans notre étude, nous montrons que cela reste vrai en présence d'une forte dépression de consanguinité des hermaphrodites lorsque la compétition entre plantules existe. A ce titre, compte tenu d'une possible augmentation de ressources et de compétition entre plantules dans les vieux stades successionnels, la plasticité phénotypique du genre sexuel pourrait être adaptative. Mais les observations terrains sur *A. borbonica*, ne vont pas dans ce sens.

Chez *A. borbonica*, la contribution du morphe pollinifère via sa fonction femelle pourrait être faible. Leurs graines sont de mauvaise qualité et leur production est minime comparativement à celle des femelles. De plus, une dispersion plus grande des graines de femelles pourrait contribuer à une diminution du coût de la compétition entre plantules. Il est nécessaire de constater qu'une estimation plus fine de l'avantage femelle est indispensable dans les prédictions d'évolution des fréquences



des morphes. L'estimation de la fonction femelle doit tenir compte de la quantité et de la qualité des graines produites, de la survie des plantules donc de la compétition et des phénomènes de dispersion qui peuvent être différents entre femelles et hermaphrodites. Nous projetons de coupler une approche génétique à cette problématique en procédant au génotypage d'individus adultes et des plantules qui sont dessous, afin de vérifier le lien maternel qui existe entre eux. Il se pourrait fort bien que les plantules trouvées sous les morphes pollinifères n'aient pas pour mère l'individu qui les domine. De tels résultats confirmeraient la possibilité d'une large supériorité de l'avantage femelle des femelles par rapport au morphe pollinifère. Ces résultats iraient dans le sens du caractère non adaptatif de la capacité de fructification du morphe pollinifère (reliquat) et d'un fonctionnement dioïque de l'espèce dans toutes les populations. Il serait à ce propos, intéressant de quantifier le coût de l'expression de la fonction femelle des morphes pollinifères, dans un but de définir s'il existe une pression de sélection pour la dioécie stricte.

Chez *A. borbonica*, la variation du genre sexuel est sous l'influence de facteurs environnementaux. Un grand nombre d'études ont mis en évidence une variation du genre sexuel des individus pouvant être influencée par le niveau de ressources (Barrett 1992, Wolfe & Schmida 1997, Humeau *et al.* 2000). Mais à notre connaissance, aucune expérimentation en populations naturelles n'a démontré l'effet des ressources sur le genre sexuel, c'est en partie, ce qui fait l'originalité de notre étude. Nous avons mis en évidence une influence du niveau de ressources sur l'expression de la fonction femelle chez le morphe pollinifère d'*A. borbonica*. Ainsi, notre étude souligne l'importance que pourrait jouer le facteur ressource dans la détermination du système de reproduction d'une espèce.

De plus, nous montrons combien il peut être nécessaire de répéter les observations sur plusieurs années pour déterminer de façon correcte le système de reproduction d'une espèce. En effet, sur les jeunes stades de la succession les morphes pollinifères de l'espèce produisent une quantité extrêmement faible de fruits et la quantification de cette production peut avoir un résultat nul si elle se fait sur peu d'observations. Les observations sur une, voire deux années, uniquement,

auraient pu nous conduire à une mauvaise estimation du genre sexuel des individus dans les jeunes stades. Ces résultats démontrent la nécessité des études à long terme et de la répétition des observations pour quantifier de façon plus précise les variations du genre sexuel chez les espèces longévives.

Nous avons vu par ailleurs, que les processus associés aux successions primaires, à l'ornithochorie et à la dioécie, pouvaient favoriser une structure spatiale agrégée des populations. Cette structure agrégée des populations pourrait entraîner des croisements non panmictiques dans la population et qui plus est, des croisements entre individus apparentés. Ainsi, les croisements consanguins couplés à un effet Walhund, pourraient expliquer que toutes les populations d'*A. borbonica* montrent des valeurs de  $F_{is}$  significatives. Mais une analyse plus fine de la structuration interne des populations est indispensable pour confirmer cette hypothèse ainsi qu'une étude de la diversité génétique avec des marqueurs cytoplasmiques. D'autre part, les valeurs de  $F_{is}$  significatives dans les anciens stades traduisent l'influence à long terme des processus associés aux successions primaires qui conditionnent la structure génétique dans les premiers stades successionnels.

Il est essentiel de pointer le bénéfice d'une double approche, génétique et écologique dans les thématiques sur lesquelles nous avons travaillées. Alors que Thébaud et Strasberg (1997) montrent que les taux de colonisation des coulées sont variables selon les espèces, il serait intéressant de voir si cette variation correspond à des variations dans les degrés de différenciation génétique des populations ?

Enfin, depuis l'arrivée de l'homme, il y a environ trois siècles, La Réunion a subi de grandes pressions anthropiques, déforestation, culture des sols, urbanisation, chasse, introduction de plantes exotiques, qui ont entraîné la perte de grand nombre d'espèces indigènes. Les plantations de géranium, du café et du thé ont remplacé la forêt primaire. Heureusement, contrairement à Rodrigue où la forêt primaire a quasiment disparue et à Maurice où il n'en subsiste qu'un à 2%, il reste encore environ 30% de la végétation primaire à La Réunion. Mais la forêt tropicale humide de moyenne et basse altitude ne subsiste que dans l'enclos perturbé par les coulées de lave, à l'exception de quelques fragments hors enclos comme la forêt de Mare Longue. Dans le Grand

Brûlé, les plantes exotiques envahissantes constituent une menace pour la dynamique de colonisation des coulées. D'ailleurs, la majorité des plantules trouvées sous les individus d'*A. borbonica* dans notre étude est composée de "pestes végétales". Aussi comprendre les mécanismes de la dynamique des espèces indigènes de la forêt tropicale de basse et moyenne altitude est un enjeu fondamental dans un cadre de conservation.

Cette étude a été menée sur une espèce pionnière, or les espèces pionnières sont des espèces clés dans les phénomènes de succession. Elles conditionnent fréquemment l'arrivée et l'installation d'autres espèces. Il paraît donc être intéressant de procéder à l'étude d'autres espèces participant au développement de la succession primaire. Notre étude pourrait être élargie à une gamme d'espèces ayant un mode de dispersion et de reproduction différents. *A. borbonica* est une espèce dioïque avec de petits fruits dispersés par les oiseaux. Qu'en est-il pour les espèces hermaphrodites, anémochores, comme *Agauria salifolia*? Ou encore pour des espèces à gros fruits pour lesquelles les capacités de dispersion pourraient être très faibles?

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Affre L., Thompson J.D., Debussche M. (1995) The reproductive biology of the Mediterranean endemic *Cyclamen balearicum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **118**, 309-330.
- Alcántara J.M., Rey P.J., Valera F., Sánchez-Lafuente A.M. (2000) Factors shaping the seed fall pattern of a bird dispersed plant. *Ecology*, **81**, 1937-1950.
- Ashman T.-L. (1994) Reproductive allocation in hermaphrodite and female plants of *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae) using four currencies. *American Journal of Botany*, **81**, 433-438.
- Ashman T.-L. (1999) Determinants of sex allocation in a gynodioecious wild strawberry: implications for the evolution of dioecy and sexual dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 648-661.
- Austerlitz F., Jung-Muller B., Godelle B., Gouyon P.H. (1997) Evolution of coalescence times, genetic diversity and structure during colonization. *Theoretical population biology*, **51**, 148-164.
- Austerlitz F., Mariette S., Machon N., Gouyon P.H., Godelle B. (2000) Effects of colonization processes on genetic diversity: Difference between annual plants and tree species. *Genetics*, **154**, 1309-1321.
- Bachelery (1981) *Le Piton de La Fournaise (Ile de La Réunion), étude volcanologique, structurale et pétrologique*. Thèse, Université de Clermont-Ferrand.
- Baker H.G. (1955) Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution*, **9**, 347-348.
- Baker H.G. (1967) Support for Baker's law - as a rule. *Evolution*, **21**, 853-856.
- Baker H.G. (1972) Seed weight in relation to environmental conditions in California. *Ecology*, **53**, 997-1010.
- Baker H.G., Cox P.A. (1984) Further thoughts on dioecism and islands. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **71**, 244-253.
- Barrett S.C.H. (1992) Gender variation and the evolution of dioecy in *Wurmbea dioica* (Liliaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **5**, 423-444.

- Barrett S.C.H., Husband B.C. (1989) The genetics of plant migration and colonization. In: *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* (A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, B.S. Weir), 254-277. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland MA.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (2001) GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Bertness M.D., Callaway R. (1994) Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 191-193.
- Beverton R., Holt S. (1957) *On the dynamics of exploited fish populations*. Series UK Ministry of Agriculture and Fisheries, London.
- Callaway R.M. (1995) Positive interactions among plants. *Botanical Review*, **61**, 306-349.
- Callaway R.M., Jones S., Ferren W.R., Jr., Parikh A. (1990) Ecology of a Mediterranean-climate estuarine wetland at Carpinteria, California: plant distributions and soil salinity in the upper marsh. *Canadian Journal of Botany*, **68**, 1139-1146.
- Callaway R.M., Walker L.R. (1997) Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology*, **78**, 1958-1965.
- Campbell D.R. (2000) Experimental tests of sex allocation theory in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 227-232.
- Carlquist S. (1966) The biota of long-distance dispersal. I. Principles of dispersal and evolution. *Quarterly Review of Biology*, **41**, 247-270.
- Carlquist S. (1966) The biota of long-distance dispersal. II. Loss of dispersability in the Pacific Compositae. *Evolution*, **20**, 30-48.
- Case A.L., Barrett S.C.H. (2004) Environmental stress and the evolution of dioecy: *Wurmbea dioica* (Colchicaceae) in Western Australia. *Evolutionary Ecology*, **18**, 145-164.

- Chapin III F.S. (1993) Physiological controls over plant establishment in primary succession. In: *Primary Succession on Land* (J. Miles, D.W.H. Walton), 161-178. Blackwell Scientific, Oxford.
- Chapin III F.S., Walker L.R., Fastie C.L., Sharman L.C. (1994) Mechanisms of primary succession following deglaciation at glacier bay, Alaska. *Ecological Monographs*, **64**, 149-175.
- Charlesworth B., Charlesworth D. (1978) A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist*, **112**, 975-997.
- Charlesworth B., Charlesworth D. (1978) A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist*, **112**, 975-997.
- Charlesworth D. (1999) Theories of the evolution of dioecy. In: *Gender and sexual dimorphism in flowering plants* (M.A. Geber, T.E. Dawson, L.F. Delph), 33-60. Springer-Verlag, Berlin.
- Charnov E.L. (1982) The theory of sex allocation. *Princeton University Press*. Princeton, New Jersey, 355p.
- Charnov E.L., Bull J.J. (1977) When is sex environmentally determined. *Nature*, **266**, 228-230.
- Charnov E.L., Maynard-Smith J., Bull J.J. (1976) Why be an hermaphrodite. *Nature*, **263**, 125-126.
- Cody M.L., Overton J.M. (1996) Short-term evolution of reduced dispersal in island plant populations. *Journal of Ecology*, **84**, 53-61.
- Connell J.H., Slatyer R.O. (1977) Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *American Naturalist*, **111**, 1119-1144.
- Cornuet J.M., Piry S., Gordon L., Estoup A., Solignac M. (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, **153**, 1989-2000.
- Costich D.E. (1995) Gender specialization across a climatic gradient: experimental comparison of monoecious and dioecious *Ecballium*. *Ecology*, **76**, 1036-1050.

- Couvet D., Gouyon P.H., Kjellberg F., Olivieri I., Pomente D., Valdeyron G. (1985) De la métapopulation au voisinage: la génétique des populations en déséquilibre. *Genetics Selection Evolution*, **17**, 407-414.
- Debussche M., Escarré J., Lepart J. (1982) Ornithochory and plant succession in Mediterranean abandoned orchards. *Vegetatio*, **48**, 255-266.
- Debussche M., Isenmann P. (1994) Bird-dispersed seed rain and seedling establishment in patchy Mediterranean vegetation. *Oikos*, **69**, 414-426.
- Debussche M., Lepart J. (1992) Establishment of woody plants in Mediterranean old fields: opportunity in space and time. *Landscape Ecology*, **6**, 133-145.
- Debussche M., Lepart J., Molina J. (1985) La dissémination des plantes à fruits charnus par les oiseaux : rôle de la structure de la végétation et impact sur la succession en région méditerranéenne. *Acta Oecologica / Oecologia Generalis*, **6**, 65-80.
- Del Moral R. (1993) Mechanisms of primary succession on volcanoes: A view from Mt. St Helens. In: *Primary Succession on Land* (J. Miles, D.W.H. Walton), 79-100. Blackwell Scientific, Oxford.
- Delph L.F. (1990) Sex-differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology*, **71**, 1342-1351.
- Delph L.F. (1996) Flower size dimorphism in plants with unisexual flowers. In: *Floral Biology: Studies on floral evolution in animal-pollinated plants* (D.G. Lloyd, S.C.H. Barrett), 217-237. Chapman & Hall, New York.
- Diggle P.K. (1993) Developmental plasticity, genetic variation, and the evolution of andromonoecy in *Solanum hirsutum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, **80**, 967-973.
- Drake D.R., Mueller-Dombois D. (1993) Population development of rain forest trees on a chronosequence of Hawaiian lava flows. *Ecology*, 1012-1019.
- Escarré J., Thompson J.D. (1991) The effects of successional habitat variation and time of flowering on seed production in *Rumex acetosella*. *Journal of Ecology*, **79**, 1099-1112.



- Giles B.E., Goudet J. (1997) Genetic differentiation in *Silene dioica* metapopulations: Estimation of spatiotemporal effects in a successional plant species. *American Naturalist*, **149**, 507-526.
- Giles B.E., Lundqvist E., Goudet J. (1998) Restricted gene flow and subpopulation differentiation in *Silene dioica*. *Heredity*, **80**, 715-723.
- Gouyon P.-H., Couvet D. (1987) A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. In: *The Evolution of Sex and its Consequences* (S.C. Stearns), 245-261. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Gray A.J. (1993) The vascular plant pioneers of primary successions: Persistence and phenotypic plasticity. In: *Primary Succession on Land* (J. Miles, D.W.H. Walton), 179-191. Blackwell Scientific, Oxford.
- Heilbut J.C. (2000) Lower species richness in dioecious clades. *American Naturalist*, **156**, 221-241.
- Heilbut J.C., Ilves K.L., Otto S.P. (2001) The consequences of dioecy for seed dispersal: modeling the seed-shadow handicap. *Evolution*, **55**, 880-888.
- Herrera J., Jordano P., Lopez-Soria L., Amat J.A. (1994) Recruitment of a mast-fruited, bird-dispersed tree: bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecological Monographs*, **64**, 315-344.
- Humeau L., Pailler T., Thompson J.D. (1999) Cryptic dioecy and leaky dioecy in endemic species of *Dombeya* (Sterculiaceae) on La Réunion. *American Journal of Botany*, **86**, 1437-1447.
- Humeau L., Pailler T., Thompson J.D. (2000) Gender variation and flower size dimorphism in the dioecious tree *Dombeya ciliata* endemic to la Réunion Island. *Biotropica*, **32**, 463-472.
- Husband B.C., Barrett S.C.H. (1996) A metapopulation perspective in plant population biology. *Journal of Ecology*, **84**, 461-469.
- Ingvarsson P.K. (1998) Kin-structured colonization in *Phalacroscopus substriatus*. *Heredity*, **80**, 456-463.

- Isabel N., Beaulieu J., Thériault P., Bousquet J. (1999) Direct evidence for biased gene diversity estimated from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology*, **8**, 477-483.
- Izhaki I., Walton P.B., Safriel U.N. (1991) Seed shadows generated by frugivorous birds in an eastern Mediterranean scrub. *Journal of Ecology*, **79**, 575-590.
- Janzen D.H. (1983) Dispersal of seeds by vertebrate guts. In: *Coevolution* (D. Futuyma, M. Slatkin), 232-262. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland MA.
- Kirman S. (2003) *Cycles biogéochimiques et biodiversité en forêt tropicale humide : étude d'une succession primaire sur les coulées basaltiques (La Réunion Océan indien)*. Thèse CEREGE Aix en Provence.
- Krivotovskii K.V., Erofeeva S.Y., Aagaard J.E., Strauss S.H. (1999) Simulation of effects of dominance on estimates of population genetic diversity and differentiation. *Journal of heredity*, **90**, 499-502.
- Le Corre V., Kremer A. (1998) Cumulative effects of founding events during colonization on genetic diversity and differentiation in an island and stepping stone model. *Journal of Evolutionary Biology*, **11**, 795-512.
- Levin D.A. (1988) Consequences of stochastic elements in plant migration. *American Naturalist*, **132**, 643-651.
- Lichter J. (2000) Colonisation constraints during primary succession on coastal Lake Michigan sand dunes. *Journal of Ecology*, **88**, 825-839.
- Litrice I. (2001) *Dynamique de la re-colonisation et variation des traits biologiques et du système de reproduction chez une espèce pionnière : Le cas d'Antirhea borbonica sur les coulées de lave à La Réunion*. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Montpellier II.
- Loiselle B.A., Sork V.L., Nason J., Graham C. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understorey shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, **82**, 1420-1425.
- MacDougall I., Chauman F.H. (1969) Isotopic dating and geomagnetic polarity studies on volcanic rocks from Mauritius, Indian ocean. *Geologic Society Annual Bulletin*, **80**, 1419-1442.

- Manicacci D., Couvet D., Belhassen E., Gouyon P.H., Atlan A. (1996) Founder effects and sex ratio in the gynodioecious *Thymus vulgaris* L. *Molecular Ecology*, **5**, 63-72.
- McCauley D., Raveill J., Antonovics J. (1995) Local founding events as determinants of genetic structure in a plant metapopulation. *Heredity*, **75**, 630-636.
- McCauley D.E. (1991) Genetic consequences of local population extinction and recolonisation. *Trends in Ecology and Evolution*, **6**, 5-8.
- Miles J., Walton D.W.H. (1993) Primary succession revisited. In: *Primary Succession on Land* (J. Miles, D.W.H. Walton), 295-302. Blackwell Scientific, Oxford.
- Nei M., Tajima F., Tateno Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, **19**, 153-170.
- Pailler T., Humeau L., Figier J., Thompson J.D. (1998) Altitudinal variation in the reproductive biology of the functionally dioecious and morphologically heterostylous island endemic *Chassalia coralliodes* (Rubiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **64**, 297-313.
- Pannell J. (1997) Mixed genetic and environmental sex determination in an androdioecious population of *Mercurialis annua*. *Heredity*, **78**, 50-56.
- Pannell J., Barrett S.C.H. (1998) Baker's law revisited: reproductive assurance in a metapopulation. *Evolution*, **52**, 657-668.
- Parrish J.A.D., Bazzaz F.A. (1979) Difference in pollination niche relationships in early and late successional plant communities. *Ecology*, **60**, 597-610.
- Prugnolle F. (1999) *Dynamique des populations et biologie de la reproduction d'Antirhea borbonica Gmel. (Rubiaceae) dans un paysage fragmenté à l'île de La réunion : implications pour la biologie de la conservation de la forêt tropicale humide de basse altitude*. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Paris.
- Rannala B., Mountain J.L. (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Genetics*, **94**, 9197-9201.
- Renner S.S., Ricklefs R.E. (1995) Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany*, **82**, 596-606.

- Rousset O., Lepart J. (2000) Positive and negative interactions at different life stages of a colonizing species (*Quercus humilis*). *Journal of Ecology*, **88**, 401-412.
- Rydin H., Borgegard S.O. (1991) Plant characteristics over a century of primary succession on islands: Lake Hjalmarén. *Ecology*, **72**, 1089-1101.
- SAS (2001) SAS/STAT Software Release 8.2. Cary, NC, SAS Institute Inc
- Slatkin M. (1977) Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinction. *Theoretical population biology*, **12**, 253-262.
- Slatkin M. (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, **47**, 264-279.
- Strasberg D. (1994) *Dynamique des forêts tropicales de l'île de La Réunion, processus d'invasion et de régénération sur les coulées volcaniques*. Thèse Université de Montpellier II.
- Strasberg D. (1996) Diversity, size composition and spatial aggregation among trees on a 1-ha rain forest plot at La Réunion. *Biodiversity and Conservation*, **5**, 825-840.
- Sultan S.E. (1987) Evolutionary implications of phenotypic plasticity in Plants. In: *Evolutionary Biology*. (M.K. Hecht, B. Wallace, G.T. Prance), Plenum Publishing Corporation.
- Sultan S.E. (1995) Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica*, **44**, 363-383.
- Tarayre M., Saumitou-Laprade P., Cuguen J., Couvet D., Thompson J.D. (1997) The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *American Journal of Botany*, **84**, 1675-1684.
- Thébaud C., Strasberg D. (1997) Plant dispersal in fragmented landscapes: a field study of woody colonization in rainforest remnants of the Mascarene archipelago. In: *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. (W.F. Laurence, R.O. Bierregaard), 321-332. Chicago University Press, Chicago.

- Thompson J.D. (1991) Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. *Trends in Ecology and Evolution*, **6**, 246-249.
- Thompson J.D., McNeilly T., Gray A.J. (1993) The demography of clonal plants in relation to successional habitat change: the case of *Spartina anglica*. In: *Primary Succession on Land* (J. Miles, D.W.H. Walton), 193-207. Blackwell Scientific, Oxford.
- Thompson J.D., Tarayre M. (2000) Exploring the genetic basis and proximate causes of variation in female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution*, **54**, 1510-1520.
- Verdcourt B., Leroy J.F., Tirvengadam D.D. (1989) Rubiacées. In: *Rubiacées. Flore des Mascareignes La Réunion, Maurice, Rodrigues* (R. Antoine, J. Bosser, I.K. Ferguson), 122-124. The sugar industry research institute ; L'office de la recherche scientifique et technique outre mer ; the royal botanic gardens, Mauritius- Paris- Kew.
- Verlaque R., Aboucaya A., Friedlender A. (2002) Les xénophytes envahissants en France : écologie, types biologiques et polyploidie. *Botanica Helvetica*, **112**, 121-136.
- Wade M.J., McCauley D.E. (1988) Extinction and recolonisation: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution*, **42**, 995-1005.
- Weller S.G., Sakai A.K., Wagner W.L., Herbst D.R. (1990) Evolution of dioecy in *Schiedea* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the hawaiian islands: biogeographical and ecological factors. *Systematic Botany*, **15**, 266-276.
- Whitlock M.C., McCauley D.E. (1990) Some population genetic consequences of colony formation and extinction: Genetic correlations within founding groups. *Evolution*, **44**, 1717-1724.
- Whittaker R.J., Bush M.B., Richards K. (1989) Plant recolonization and vegetation succession on the Krakatau Islands, Indonesia. *Ecological Monographs*, **59**, 59-123.
- Wolfe L.M., Shmida A. (1997) The ecology of sex expression in a gynodioecious Israeli desert shrub (*Ochradenus baccatus*). *Ecology*, **78**, 101-110.

- Wood D.M., Del Moral R. (1987) Mechanisms of early primary succession in subalpine habitats on Mount St Helens. *Ecology*, **68**, 780-790.

## **ANNEXES**

**MULTIPLE GENETIC CONTRIBUTIONS TO PLANT PERFORMANCE IN *THYMUS VULGARIS***

John D. Thompson, Michèle Tarayre, Perrine Gauthier, Isabelle Litrico  
and Yan B. Linhart

Journal of ecology 2004 92, 45-56



# Multiple genetic contributions to plant performance in *Thymus vulgaris*

JOHN D. THOMPSON\*, MICHELE TARAYRE\*†, PERRINE GAUTHIER\*,  
ISABELLE LITRICO\* and YAN B. LINHART‡

\*Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France,

†UMR-CNRS 6553, Evolution des Populations et des Espèces, Campus de Beaulieu, Université de Rennes 1, 35042

Rennes, France, and ‡Department of Biology, University of Colorado, Boulder, Colorado, 80309–0334, USA

## Summary

1 Diverse genetic factors can affect plant performance. Here we evaluate how maternal and paternal origin, maternal and offspring sexual phenotype and degree of outcrossing jointly influence performance of gynodioecious *Thymus vulgaris*.

2 In uniform conditions we quantified size and survival of second-generation ( $G_2$ ) offspring produced by selfing and outcrossing on the open-pollinated offspring ( $G_1$ ) of  $G_0$  females from four populations that differ in sex ratio, selfing rate and chemical type. We controlled for environmental variation, maternal effects and plant age.

3 Offspring with maternal parents from populations dominated by plants that synthesize phenolic monoterpenes had greater survival and size than those from populations with non-phenolic chemotypes. In addition, outcrossing among populations with pollen donors from non-phenolic populations significantly reduced progeny performance. These results suggest chemotype-mediated local adaptation.

4 The progeny of hermaphrodites showed significant inbreeding depression, which despite the pollination treatment  $\times$  family and pollination treatment  $\times$  population interactions, showed no consistent variation in relation to population inbreeding levels.

5 For a given level of outcrossing, the progeny of hermaphrodites showed greater among-family and among-population variation in plant size than those of females. Variation in nuclear restorer gene composition across cytoplasmic backgrounds may cause this variation.

6 In *T. vulgaris*, diverse genetic factors jointly affect performance, a result with general implications for understanding fitness variation in natural populations.

**Key-words:** gynodioecy, inbreeding depression, Lamiaceae, local adaptation, monoterpene composition

*Journal of Ecology* (2004) **92**, 45–56

## Introduction

Plant performance, in terms of survival to reproduction and adult size, has repeatedly been shown to vary within and between natural populations. This variation, because of its close relationship to individual fitness, can significantly contribute to population persistence in space and time. Understanding the causes of variation in performance is thus a key task for ecologists and evolutionary biologists (Weiner 1988).

Variation in the size of adult plants can be caused by both external ecological factors, e.g. competition (Schmitt *et al.* 1987), herbivory (Escarré *et al.* 1999),

parasitism (McCrea *et al.* 1985) and environmental heterogeneity (Bell & Lechowicz 1991; Thompson *et al.* 1991a,b), and those inherent to the plants themselves, e.g. the timing of germination (Donohue 2002), population age (Thompson *et al.* 1993), genetic and environmental maternal effects (Mazer & Gorchov 1996) and genetic effects related to maternal and offspring sexual phenotype (Eckhart 1992; Delph 1999), ploidy level (Petit & Thompson 1997; Bretagnolle & Thompson 2001) and inbreeding depression (Husband & Schemske 1996). These studies suggest that a focus on how different genetic factors jointly affect variation in performance would be valuable.

In this study we examine how different genetic factors impact on plant performance in wild thyme, *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), which shows polymorphic

variation in the genes controlling sexual function and the production of the dominant monoterpenes that compose its essential oil (Thompson *et al.* 1998). First, all known populations of this species are gynodioecious, i.e. they contain female and hermaphrodite plants. The sex ratio of populations in southern France varies from around 5% females up to more than 90% females, with a mean value of just over 60% females (Dommeé *et al.* 1978). This striking sex ratio variation is probably greatly influenced by stochastic effects during colonization of new sites (Couvét *et al.* 1998). In addition, as hermaphrodites are self-compatible their progeny may suffer inbreeding depression that may further enable female frequency to increase. Females set more seeds than hermaphrodites (Assouad *et al.* 1978), a difference that is maintained even in the absence of inbreeding effects, which thus suggests that resource compensation for the lack of pollen production by females occurs (Thompson & Tarayre 2000). The effects of inbreeding and maternal sex on progeny survival and adult size have not, however, been studied in this species. In addition, the offspring of outcrossed females may be superior to those of outcrossed hermaphrodites if greater gametophytic selection occurs in female flowers, or as a result of cytoplasmic gene variation and negative pleiotropic effects of nuclear restorer alleles (or closely linked genes) (Delph & Mutikainen 2003). Quantifying variation in performance among families produced by each sexual phenotype can provide information on these genetic causes of maternal sex effects.

With regard to monoterpene composition, six chemically distinct chemotypes occur. These chemotypes have a well-documented genetic control (Vernet *et al.* 1986) and show marked spatial variation in relative abundance (Granger & Passet 1973; Vernet *et al.* 1977a,b; Gouyon *et al.* 1986; Thompson 2002). Chemotypes whose dominant monoterpene has a phenolic aromatic structure (the carvacrol and thymol chemotypes) are abundant on shallow, stony soils in areas where winter temperatures tend to be mild, i.e. at elevations less than 400 m close to the Mediterranean (coast). In contrast, non-phenolic chemotypes (geraniol, alpha-terpineol, thuyanol and linalool) dominate areas where soils are

deeper and more humid, and in areas with frequent freezing temperatures below  $-10^{\circ}\text{C}$ , i.e. at elevations above 400 m or in frost hollows with a temperature inversion. The precise causes of this spatial differentiation remain unknown, although climate, soils and biotic factors probably interact to determine the pattern (Thompson 2002).

The primary goal of this study is to quantify how different genetic factors related to sex expression and chemotype affect plant performance in *Thymus vulgaris*. To do so we quantify seedling size, adult size and survival over 4 years in second-generation ( $G_2$ ) offspring (grown in a uniform field environment) produced from controlled crosses on  $G_1$  plants (themselves grown in a uniform environment). The experimental design allowed us to control for potential effects due to maternal environment, age, environmental heterogeneity and competition. In addition, no major herbivores affected performance in the field environment. We quantify performance variation among families produced by both maternal sex phenotypes from four populations that differ in the dominant chemotype, sex ratio and selfing rate and that were produced by controlled selfing and different degrees of outcrossing. We ask the following questions. First, does progeny performance in a given environment depend on the chemotype of maternal and paternal parents? Secondly, do the progeny of hermaphrodites suffer significant inbreeding depression when self-pollinated and is this consistent among populations? Thirdly, for a given level of outcrossing, do the offspring from females and hermaphrodites differ in performance?

## Methods

### STUDY MATERIAL AND EXPERIMENTAL DESIGN

The offspring from four *Thymus vulgaris* populations were used in this study. These populations differ markedly in sex ratio, population heterozygosity, selfing rates on hermaphrodites and the occurrence of different chemotypes (Table 1). The populations are situated in and around the St Martin-de-Londres valley, approximately

**Table 1** Characteristics of the four natural populations of *T. vulgaris* used as  $G_0$  seed sources.

|                                                  | Population          |                     |                |            |
|--------------------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|------------|
|                                                  | Non-phenolic-1      | Non-phenolic-2      | Phenolic-1     | Phenolic-2 |
| Dominant chemotype*                              | $\alpha$ -terpineol | thuyanol & linalool | thymol         | carvacrol  |
| Population location                              | La Borie            | Courège             | Pompignan-haut | Tourrière  |
| Sex ratio (% females)†                           | 26%                 | 62%                 | 11%            | 80%        |
| Population inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ )‡  | 0.40                | -0.06               | 0.08           | 0.05       |
| Hermaphrodite selfing rate‡                      | -                   | $\approx 0$         | $\approx 0$    | 0.33       |
| Inbreeding depression on seed set & germination‡ | 0.58                | -0.14               | -0.09          | 0.36       |

\*Thompson *et al.* (2003).

†Tarayre & Thompson (1997).

‡Thompson & Tarayre (2000).

25 km north of Montpellier in southern France. Two non-phenolic populations, Courège and La Borie, occur *c.* 3 km apart within the valley, with two phenolic populations, the Tourrière population 4 km south on the southern crest of the valley and the Pompignan-haut population approximately 8 km north of the valley populations. The offspring from these four populations have formed the basis of other recent studies on different aspects of gynodioecy in thyme, i.e. the causes of female fertility advantage (Thompson & Tarayre 2000), genetic variation in flower size dimorphism (Thompson *et al.* 2002) and sex allocation variation in hermaphrodites (Ehlers & Thompson 2004).

In each of the four populations, 30 fruits from open pollination were collected on each of 10 female plants (which we refer to as generation zero or  $G_0$ ) in July 1995 (see details in Thompson & Tarayre 2000). The open-pollinated ( $G_1$ ) seeds of each family were scarified by automatic shaking for 45 min in a small tube half-filled with Fountainebleau sand. Seeds were sown in September 1995 in seed trays filled with a sterilized 1 : 1 : 1 sand : humus : garden soil mix and left to germinate

under uniform conditions in the glasshouse at the CEFE-CNRS experimental gardens in Montpellier. Approximately 25 seedlings from each mother were transplanted and grown to flowering in 1.5 L plastic pots with the same soil mix and placed outdoors. Depending on sex ratio, plant vigour, flowering intensity and synchrony, one to two females and one to two hermaphrodites in each  $G_1$  family were used as maternal parents and subject to four pollination treatments in an insect-free unheated glasshouse during spring 1997: (i) selfing (only on hermaphrodites); (ii) within-family cross, i.e. cross-pollination with a hermaphrodite from the same family; (iii) between-family cross, i.e. cross-pollination with a hermaphrodite from a different family but the same population; and (iv) between-population cross, i.e. cross pollination with a randomly chosen hermaphrodite from another population (which could be phenolic or non-phenolic).

Each treatment was done on 30–50 flowers on a single randomly chosen branch of each plant. Due to poor flowering by both hermaphrodites and females in some families the number of  $G_1$  families actually used

**Table 2** Numbers of  $G_2$  plants (hermaphrodite-female) in the progenies of  $G_1$  hermaphrodites (H) and females (F). See text for details

| Population     | Family | Selfing |   | Within-family cross |       | Between-family cross |       | Between-population cross |       |
|----------------|--------|---------|---|---------------------|-------|----------------------|-------|--------------------------|-------|
|                |        | H       | F | H                   | F     | H                    | F     | H                        | F     |
| Non-phenolic-1 | 1      | 13–3    | – | 6–1                 | 5–4   | 5–1                  | 5–5   | 11–1                     | 5–4   |
|                | 2      | –       | – | –                   | 1–1   | –                    | 10–10 | 2–0                      | 5–14  |
|                | 3      | 2–0     | – | 11–0                | 2–5   | 9–0                  | 3–5   | 3–1                      | 3–3   |
|                | 4      | 7–0     | – | 10–0                | 6–2   | 2–0                  | 5–4   | 13–3                     | 6–3   |
|                | 5      | 6–1     | – | 6–1                 | 15–4  | 14–0                 | 10–9  | 14–1                     | 15–2  |
|                | 6      | 12–3    | – | 5–5                 | 6–4   | 11–3                 | 3–4   | 8–6                      | 8–2   |
|                | 7      | 1–0     | – | 1–0                 | 6–3   | 1–1                  | 2–6   | 1–0                      | –     |
|                | 8      | 1–0     | – | 10–0                | 2–3   | 17–0                 | 2–1   | 8–6                      | 1–2   |
|                | Total  | 42–7    | – | 49–7                | 43–26 | 59–5                 | 40–44 | 60–15                    | 43–30 |
| Non-phenolic-2 | 1      | 7–2     | – | –                   | 9–9   | 0–2                  | 10–7  | 1–0                      | 0–20  |
|                | 2      | 3–0     | – | –                   | 9–8   | 5–0                  | 5–8   | 1–0                      | 0–10  |
|                | 3      | 3–1     | – | 9–1                 | 10–8  | 6–4                  | 3–7   | 1–4                      | 0–18  |
|                | 4      | 0–1     | – | –                   | 12–6  | 1–1                  | 6–10  | –                        | 0–9   |
|                | 5      | 5–1     | – | 1–0                 | 12–8  | 2–2                  | 5–7   | 11–7                     | 0–17  |
|                | Total  | 18–5    | – | 10–1                | 52–39 | 14–9                 | 29–39 | 14–11                    | 0–74  |
| Phenolic-1     | 1      | 1–0     | – | 4–1                 | 2–0   | 9–1                  | 2–5   | 8–3                      | 0–10  |
|                | 2      | 1–0     | – | 2–0                 | 8–12  | –                    | 8–9   | 5–0                      | 8–4   |
|                | 3      | 9–0     | – | 10–0                | 4–8   | –                    | 7–11  | 8–0                      | 6–3   |
|                | 4      | 0–2     | – | –                   | 4–8   | –                    | 6–12  | 4–3                      | 1–19  |
|                | 5      | 6–0     | – | 3–1                 | 6–7   | 7–1                  | 5–5   | 2–1                      | 0–18  |
|                | 6      | 7–3     | – | –                   | 1–2   | 0–3                  | 0–4   | 3–3                      | 1–7   |
|                | 7      | –       | – | –                   | 6–8   | 1–0                  | 4–4   | –                        | 0–16  |
|                | 8      | 4–3     | – | 0–1                 | –     | 6–2                  | –     | –                        | –     |
|                | Total  | 28–8    | – | 19–3                | 31–45 | 23–7                 | 32–50 | 30–10                    | 16–77 |
| Phenolic-2     | 1      | –       | – | –                   | 2–11  | 5–2                  | 14–5  | 1–6                      | 1–17  |
|                | 2      | 1–3     | – | 7–2                 | 0–8   | 7–5                  | 6–4   | 2–7                      | 4–10  |
|                | 3      | 0–4     | – | 4–1                 | 7–7   | 1–8                  | 8–9   | 3–5                      | 0–10  |
|                | 4      | 3–0     | – | 3–3                 | 2–10  | 0–1                  | 0–19  | 7–2                      | 0–16  |
|                | 5      | 1–10    | – | 4–1                 | 5–1   | 0–10                 | 3–5   | –                        | 5–4   |
|                | 6      | 6–2     | – | 0–3                 | 12–7  | 5–4                  | 9–5   | 1–1                      | 5–11  |
|                | 7      | 2–0     | – | 2–0                 | 5–7   | 7–0                  | 5–15  | –                        | 1–16  |
|                | 8      | 3–1     | – | 1–1                 | 1–5   | 2–2                  | 5–3   | 0–2                      | 1–10  |
|                | Total  | 16–20   | – | 21–11               | 34–56 | 27–32                | 50–65 | 14–23                    | 17–94 |

for crosses (see Table 2) varied from five (population 2) to eight (remaining populations). After scarification by automatic shaking for 45 min in a small tube half-filled with fine sand, the seeds of each maternal parent–treatment combination (hereafter a  $G_2$  progeny array) were sown in plastic seed trays laid out in a single randomized block in an unheated glasshouse in March 1998. More details of growing conditions and the pollination trial are in Thompson & Tarayre (2000).

In July 1998 up to 10 seedlings of each  $G_2$  progeny array were transplanted to 0.5-L plastic pots filled with the same soil mix as above. Seedlings were grown one per pot and pots left outdoors in a single randomized block. In February 1999 seedlings were transplanted to a single randomized block in an open field in the CEFÉ-CNRS experimental gardens in Montpellier. The block contained 1814 plants in rows 1 m apart, with plants spaced at 35-cm intervals within each row. Wild thyme grows semi-naturally around this experimental field, which has a subhumid Mediterranean climate and a stony calcareous soil similar in composition to that of natural populations in the nearby countryside. The site occurs in the climatic and geographical zone dominated by phenolic chemotypes, notably the carvacrol type from the Tourrière site. Plant survival was quantified yearly during the flowering period for 4 years from the time of transplantation into pots (August 1998) to flowering in June 2002. The size of all plants was measured as (maximum height  $\times$  crown diameter)/2 when seedlings were roughly 6 months old (November 1998) and at the end of the flowering period in early June 2000. This surface area provides an accurate estimation of plant size in *T. vulgaris*.

#### DATA ANALYSES

To analyse variation in plant size at the seedling (6 months) stage and at reproduction (year 2) we carried out mixed-model ANOVA using PROC GLM in SAS (SAS 2001). We used type IV sums of squares, which are appropriate for experimental designs such as this that contain missing cells (Table 2). The use of type IV sums of squares means that different testable hypotheses may exist. In the tests we used, the coefficients of any effect are distributed equitably across higher-level effects. This is the standard method employed in the calculation of type IV sums of squares. To check that results would not change in different model situations we altered the order of effects in the model; this produced no qualitative change in our results.

ANOVA was done in three ways. First, in order to compare performance variation among maternal sex phenotypes whilst controlling for cross type, we compared offspring of the two maternal sex phenotypes but excluded offspring from selfed hermaphrodites (treatment 1). Secondly, in order to quantify inbreeding depression, we compared the effect of treatment on the offspring of hermaphrodite mothers in all four treatments. Thirdly, in order to test for an effect of the

population of origin of the male parent (phenolic or non-phenolic chemotype) on offspring performance, we compared variation among offspring with the same or different chemotype as a male parent in treatment 4.

ANOVA was done at different levels. First, analysis of a complete experimental design was performed with population, family nested in population, crossing treatment, maternal ( $G_1$ ) sexual phenotype and  $G_2$  sexual phenotype as main effects and all interactions among these effects. Family within population and its interaction with the different fixed effects were specified as random effects in the ANOVA and denominator degrees of freedom calculated using Satterthwaite's approximation. Secondly, all three-way and four-way interaction terms and any main effects that did not contribute to significant main or interaction terms were excluded. Thirdly, the same ANOVA was done on each population independently. Residual values were always checked to conform to ANOVA assumptions in all ANOVAS. Differences among treatments and populations were further assessed with the contrast statement in PROC GLM. The sequential Bonferroni method was used to account for multiple comparisons (Rice 1989).

We quantified survival rates in each progeny array after 4 years of growth. Survival data (number of surviving plants and number of mortalities per family) were analysed with PROC CATMOD (SAS 2001). Some families had small sample sizes, which made it impossible to properly estimate differences among families due to biased weighting among families. We therefore pooled all data within each population by treatment by maternal sex combination since. This obviously introduces a small degree of pseudo-replication but given the numbers of families we used from four different populations we do not feel that this compromises our analysis. Survival analyses were made in the same way as ANOVA, i.e. either by including both maternal sex phenotypes and excluding pollination treatment 1, or by excluding females and analysing all four pollination treatments in the offspring of hermaphrodites.

Inbreeding depression on the two estimates of plant size and on survival was calculated for the offspring of hermaphrodites as:

$$\delta = (W_3 - W_1)/W_{\max} \quad \text{eqn 1}$$

where  $W_1$  and  $W_3$  are an estimate of performance in pollination treatments 1 and 3, respectively, and  $W_{\max}$  is the larger of the two values. If  $W_3 > W_1$  then outcrossing leads to higher performance than selfing, and the equation is the standard equation for inbreeding depression, which varies from 0 to +1 (Charlesworth & Charlesworth 1987). If inbreeding led to higher performance than outcrossing, modification of the standard equation allows values to vary between 0 and –1, thus allowing for symmetry in the calculation of population level inbreeding depression (e.g. Agren & Schemske 1993; Affre & Thompson 1999).

## Results

MATERNAL SEX AND MATERNAL AND  
PATERNAL CHEMOTYPE EFFECTS ON  
PERFORMANCE

## Seedling size

In the overall ANOVA of seedling size, only the pollination treatment  $\times$  maternal sex  $\times$  family interaction was significant ( $F_{29,11} = 3.83$ ,  $P < 0.05$ ). In a reduced ANOVA model (excluding three-way and four-way interaction terms and offspring sex) we detected significant family (within population)  $\times$  maternal sex and family  $\times$  pollination treatment interactions (Table 3a). ANOVA on each population separately showed a significant pollination treatment  $\times$  maternal sex  $\times$  family interaction in the offspring from La Borie ( $F_{11,415} = 2.65$ ,  $P < 0.05$ ), Pompignan ( $F_{5,320} = 9.60$ ,  $P < 0.001$ ) and Tourrière ( $F_{11,417} = 2.6$ ,  $P < 0.05$ ) but not in the offspring from Courège ( $F_{4,280} = 1.98$ ,  $P > 0.05$ ). The smaller number of families in this population probably reduced power to detect variation (Table 2). These results indicate genetic variation among families in the effect of pollination treatment on seedling size, with this effect depending on the maternal sex that produced the offspring (Fig. 1).

ANOVA of outcrossing between populations including an effect of paternal origin (phenolic vs. non-phenolic populations) showed significant interactions between maternal sex  $\times$  maternal population ( $F_{3,514} = 4.3$ ,  $P < 0.01$ ) and maternal sex  $\times$  paternal origin ( $F_{1,514} = 5.9$ ,  $P < 0.05$ ) and significant effects of paternal origin ( $F_{1,514} = 16.8$ ,  $P < 0.001$ ) and maternal family ( $F_{24,514} = 2.1$ ,  $P < 0.01$ ). These results are primarily due to the greater size of seedlings with maternal and/or paternal parents obtained from a phenolic population (Figs 1 and 2).

## Adult size

ANOVA showed significant effects due to population and treatment and the existence of significant maternal sex

$\times$  population and maternal sex  $\times$  family interactions and a significant pollination treatment  $\times$  family interaction (Table 3b). These interactions indicate that the influence of maternal sex on progeny performance depends on the population and family, i.e. shows genetic variation. Coefficients of variation in plant size show greater variation in the offspring of hermaphrodites than in the offspring of females among populations (CV hermaphrodites = 18.7%, CV females = 9.8%), hence the significant population  $\times$  maternal sex interaction in ANOVA. As a result of this variation, progeny of hermaphrodites can be larger or smaller than those of females, depending on the population (Fig. 1). Among families in each population, the progeny of hermaphrodites and females showed very different amounts of variation in size in the two populations with hermaphrodite-biased sex ratios (La Borie, CV hermaphrodites = 21%, CV females = 7%; Pompignan-haut, CV hermaphrodites = 36%, CV females = 12%) but similar amounts of variation in size in the populations with female-biased sex ratios (Courège, CV hermaphrodites = 13%, CV females = 8%; Tourrière, CV hermaphrodites = 10%, CV females = 10%).

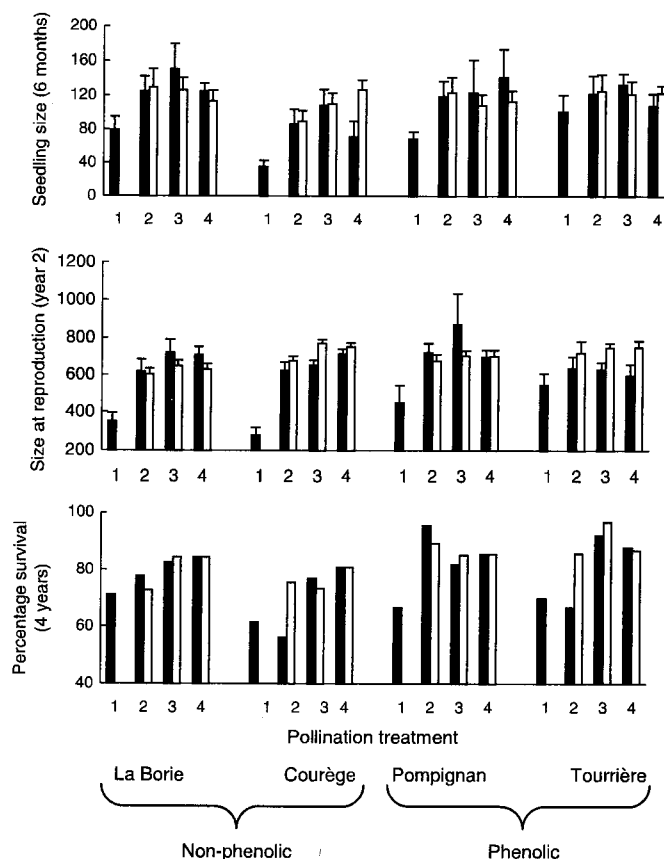
ANOVA for each pollination treatment showed significant differences in size among populations for the offspring of both sexual phenotypes after within-family crosses ( $F_{3,30} = 5.95$ ,  $P < 0.01$ ) and outcrossing within-populations ( $F_{3,25} = 3.9$ ,  $P < 0.05$ ). Scheffé means test showed that for within-family crosses, the size of plants was significantly ( $P < 0.05$ ) greater in the two phenolic populations (Pompignan and Tourrière) than in the two non-phenolic populations (Courège and La Borie) and for within-population crosses the size of plants from Tourrière was greater than those from Courège (Fig. 1). There was no significant variation due to maternal population after outcrossing among-populations ( $F_{3,32} = 1.12$ ,  $P > 0.1$ ).

In ANOVA of adult size in treatment 4, a significant maternal sex  $\times$  maternal population interaction ( $F_{3,495} = 3.7$ ,  $P < 0.01$ ) and significant main effects of paternal origin ( $F_{1,495} = 6.2$ ,  $P < 0.05$ ) and maternal

**Table 3** Reduced model ANOVA based on type IV sums of squares (excluding three-way and four-way interactions and the effect of sexual phenotype) of  $G_2$  offspring size from four populations of *Thymus vulgaris*

| Source of variation                       | (a) Seedling size |       |             |       |          | (b) Size at reproduction |        |             |        |          |
|-------------------------------------------|-------------------|-------|-------------|-------|----------|--------------------------|--------|-------------|--------|----------|
|                                           | Numerator         |       | Denominator |       | <i>F</i> | Numerator                |        | Denominator |        | <i>F</i> |
|                                           | d.f.              | MS    | d.f.        | MS    |          | d.f.                     | MS     | d.f.        | MS     |          |
| Population                                | 3                 | 22147 | 32          | 10455 | 2.12 NS  | 3                        | 887460 | 37          | 80828  | 10.98*** |
| Family (population)                       | 25                | 14224 | 51          | 12815 | 0.36 NS  | 25                       | 104389 | 34          | 126143 | 0.69 NS  |
| Maternal sex                              | 1                 | 933   | 46          | 5975  | 0.16 NS  | 1                        | 25799  | 40          | 85245  | 0.58 NS  |
| Treatment                                 | 2                 | 10738 | 70          | 9588  | 1.12 NS  | 2                        | 272920 | 95          | 63543  | 4.30*    |
| Treatment $\times$ population             | 6                 | 8795  | 56          | 11631 | 0.76 NS  | 6                        | 127935 | 63          | 70592  | 1.81 NS  |
| Treatment $\times$ family (population)    | 49                | 13325 | 1469        | 3963  | 3.36***  | 49                       | 76598  | 1401        | 44432  | 1.72**   |
| Treatment $\times$ maternal sex           | 2                 | 6207  | 1469        | 3963  | 1.57 NS  | 2                        | 14254  | 1401        | 44432  | 0.73 NS  |
| Maternal sex $\times$ population          | 3                 | 10720 | 43          | 6086  | 1.76 NS  | 3                        | 637860 | 38          | 86441  | 7.38***  |
| Maternal sex $\times$ family (population) | 24                | 7461  | 1469        | 3963  | 1.88**   | 24                       | 11431  | 1401        | 44432  | 2.58***  |

NS = not-significant, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Fig. 1** Mean ( $\pm$  SE) seedling size, size at reproduction and survival of offspring from either female (open bars) or hermaphrodite maternal plants of *Thymus vulgaris* from two non-phenolic and two phenolic populations. Pollination treatments are: (1) self-pollination; (2) cross-pollination, same family; (3) cross-pollination, different family – same population; and (4) cross-pollination, different population. Values of size are mean values across families, survival percentages are based on a pooled sample in each population by treatment by maternal sex combination.

family ( $F_{24,495} = 1.7$ ,  $P < 0.05$ ) were detected. Again, these results are primarily due to greater performance of plants with maternal and/or paternal parents from a phenolic population (Figs 1 and 2).

#### Survival rates

Survival rates showed a significant population  $\times$  treatment interaction (d.f. = 6,  $\chi^2 = 19.0$ ,  $P < 0.01$ ) and a significant effect of population (d.f. = 3,  $\chi^2 = 18.43$ ,  $P < 0.01$ ). The population  $\times$  treatment interaction is largely due to the fact that significant differences among populations occurred in the progeny of within-family (d.f. = 3,  $\chi^2 = 9.91$ ,  $P < 0.05$ ) and within-population (d.f. = 3,  $\chi^2 = 17.69$ ,  $P < 0.001$ ) crosses but not in the progeny of among-population crosses (d.f. = 3,  $\chi^2 = 1.32$ ,  $P > 0.5$ ). In the former two treatments, differences among populations were primarily due to differences between the non-phenolic (Courège and La Borie) and phenolic (Pompignan and Tourrière) populations (Table 4a). No effects due to maternal sex were detected in these analyses.

Survival rates in progeny from among-population crosses showed a significant maternal population  $\times$

paternal origin interaction (d.f. = 3,  $\chi^2 = 8.7$ ,  $P < 0.05$ ). The two main effects of maternal population and paternal origin were not significant. Separate ANOVA by population showed significant differences due to paternal origin in the two phenolic populations, Pompignan (d.f. = 1,  $\chi^2 = 4.1$ ,  $P < 0.05$ ) and Tourrière (d.f. = 1,  $\chi^2 = 4.2$ ,  $P < 0.05$ ), but not in the two non-phenolic populations. The effect of paternal origin was not the same in the two phenolic populations (Fig. 2), hence the overall interaction between maternal and paternal origin.

Analysis of survival rates including an effect due to sexual phenotype of the offspring showed no significant difference in survival rates of hermaphrodites and females. Obviously, pre-reproductive mortality could not be included in this analysis.

#### INBREEDING DEPRESSION IN THE PROGENY OF HERMAPHRODITES

In the second set of ANOVA of seedling size and size at reproduction, i.e. comparing offspring from hermaphrodites among all four treatments, we did not use the term 'sexual phenotype' due to the fact that in treatment 1

**Table 4** Pair-wise contrasts in PROC CATMOD analyses of 4-year survival rates (a) among populations for the progeny produced by each pollination treatment and (b) among pollination treatments for the progeny of hermaphrodites (including selfing). Analyses were conducted in each pollination treatment (a) or population (b) that showed a significant effect of treatment or population respectively

## (a) Full data set

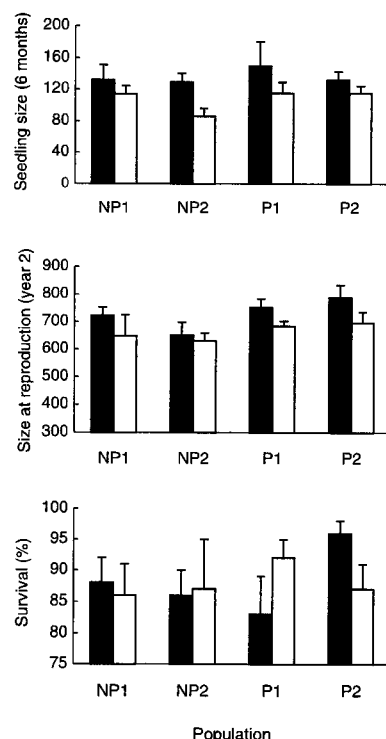
| Contrast (treatment)    | d.f. | Overall | Within-family cross | Within-population cross |
|-------------------------|------|---------|---------------------|-------------------------|
| La Borie vs. Courège    | 1    | 4.2*    | 4.8*                | 0.1 NS                  |
| La Borie vs. Pompignan  | 1    | 3.2 NS  | 2.2 NS              | 8.2**                   |
| La Borie vs. Tourrière  | 1    | 5.2*    | 4.4*                | 3.9*                    |
| Courège vs. Pompignan   | 1    | 11.0**  | 1.9 NS              | 9.7**                   |
| Courège vs. Tourrière   | 1    | 14.8**  | 1.3 NS              | 5.0*                    |
| Pompignan vs. Tourrière | 1    | 0.1 NS  | 0.2 NS              | 0.5 NS                  |

## (b) Only hermaphrodites

| Contrast (treatment)                           | d.f. | Overall | Pompignan | Tourrière |
|------------------------------------------------|------|---------|-----------|-----------|
| Self vs. within-family cross                   | 1    | 2.8 NS  | 4.8*      | 0.1 NS    |
| Self vs. within-population cross               | 1    | 12.4**  | 2.2 NS    | 8.2**     |
| Self vs. among-population cross                | 1    | 13.3**  | 4.4*      | 3.9*      |
| Within-family cross vs. among-family cross     | 1    | 0.9 NS  | 1.9 NS    | 9.7**     |
| Within-family cross vs. among-population cross | 1    | 1.2 NS  | 1.3 NS    | 5.0*      |
| Among-family cross vs. among-population cross  | 1    | 0.0 NS  | 0.2 NS    | 0.5 NS    |

\* $P < 0.05$  (i.e. without correction of significance level).

\*\*Significant after sequential Bonferroni correction (Rice 1989).



**Fig. 2** Mean ( $\pm$  SE) seedling size, size at reproduction and survival of offspring from controlled pollinations on female and hermaphrodite maternal plants (pooled) of *Thymus vulgaris* from two non-phenolic populations (NP1 = La Borie, NP2 = Courège) and two phenolic populations (P1 = Pompignan, P2 = Tourrière) with a pollen donor from a phenolic (closed bars) or a non-phenolic (open bars) population. Means were calculated as in Fig. 1.

(i.e. produced by selfing) offspring tend to be hermaphrodite and several families have no females (Table 2).

## Seedling size

ANOVA showed a significant treatment  $\times$  family (population) interaction ( $F_{56,578} = 3.14$ ,  $P < 0.0001$ ), a significant effect of treatment ( $F_{3,80} = 4.22$ ,  $P < 0.01$ ) and a significant effect of population ( $F_{3,37} = 2.97$ ,  $P < 0.05$ ) on seedling size. Scheffé multiple comparisons (at  $P < 0.05$ ) showed (a) that the effect of treatment was due to significantly smaller size after selfing compared with all three outcrossing treatments (see Table 5), and (b) that the effect of population was due to significantly smaller seedlings in the Courège population compared with the three other populations (which did not differ from one another).

A significant treatment  $\times$  family interaction was detected in all four populations, i.e. La Borie ( $F_{18,248} = 2.95$ ,  $P < 0.001$ ), Courège ( $F_{8,72} = 2.97$ ,  $P < 0.01$ ), Pompignan ( $F_{13,112} = 4.85$ ,  $P < 0.001$ ) and Tourrière ( $F_{17,146} = 3.00$ ,  $P < 0.01$ ) and a significant effect of treatment in plants from La Borie ( $F_{18,248} = 2.95$ ,  $P < 0.001$ ) and Courège ( $F_{8,72} = 2.97$ ,  $P < 0.01$ ). Scheffé multiple comparisons (at  $P < 0.05$ ) showed that the effect of treatment was due to significantly smaller size after selfing compared with outcrossing within- and among-populations.

## Adult size

ANOVA of adult size showed a significant treatment  $\times$  family (population) interaction ( $F_{55,535} = 1.96$ ,  $P < 0.01$ ),

**Table 5** Inbreeding depression in the offspring of  $G_1$  hermaphrodite maternal parents from four populations of *Thymus vulgaris*. Inbreeding depression estimates concern comparison of selfed offspring with offspring from outcrossing with a pollen donor from the same population (within-population crosses). Inbreeding depression on survival was calculated using pooled data of all individuals in each population by treatment combination, for plant size mean values per family were used

|                                     | La Borie | Courège | Pompignan-haut | Tourrière |
|-------------------------------------|----------|---------|----------------|-----------|
| Seedling size (6 months)            | 0.44     | 0.65    | 0.31           | 0.13      |
| Plant size at reproduction (year 2) | 0.52     | 0.43    | 0.49           | 0.15      |
| Survival (4 years)                  | 0.14     | 0.20    | 0.18           | 0.24      |

a significant effect of treatment ( $F_{3,94} = 13.12$ ,  $P < 0.001$ ) and a significant effect of population ( $F_{3,32} = 5.36$ ,  $P < 0.05$ ). Scheffé multiple comparisons (at  $P < 0.05$ ) showed (a) that the effect of treatment was due to significantly smaller size after selfing compared with all three outcrossing treatments (see Table 5) and a significant increase in size after outcrossing among families and populations compared with within-families, and (b) that the effect of population was due to significantly smaller seedlings in the Courège population compared with the three other populations (which did not differ from one another).

ANOVA within each population showed a significant treatment  $\times$  family interaction in the offspring from La Borie ( $F_{18,226} = 2.39$ ,  $P < 0.01$ ), Courège ( $F_{8,66} = 2.79$ ,  $P < 0.01$ ) and Tourrière ( $F_{17,138} = 1.67$ ,  $P < 0.05$ ). A significant effect of treatment was detected in the offspring from La Borie ( $F_{3,37} = 7.34$ ,  $P < 0.01$ ), Courège ( $F_{3,9} = 4.24$ ,  $P < 0.05$ ) and Pompignan ( $F_{3,15} = 3.1$ ,  $P < 0.05$ ) populations. Scheffé multiple comparisons confirmed that selfing produced significantly ( $P < 0.05$ ) smaller plants than outcrossing in all three populations.

#### Survival rates

Survival of offspring from hermaphrodites showed a significant effect of treatment (d.f. = 3,  $\chi^2 = 18.8$ ,  $P < 0.001$ ) but no significant effect of population or the population  $\times$  treatment interaction. Pair-wise contrasts showed that selfed offspring had significantly lower survival than offspring from outcrossing within- and among-populations (Table 4b, Table 5). The effect of treatment was significant in two populations, Pompignan (d.f. = 3,  $\chi^2 = 8.3$ ,  $P < 0.05$ ) and Tourrière (d.f. = 3,  $\chi^2 = 13.7$ ,  $P < 0.01$ ). Pair-wise contrasts showed that this effect of treatment in these two populations was primarily due to a decline in survival after selfing, and to a lesser extent within-family crosses, compared with outcrossing within- and among-populations (Table 4b, Table 5).

Due to the differences among populations in the expression of inbreeding depression on plant size at reproduction, we performed an analysis of survival in the progeny of selfed and outcrossed (within-population) hermaphrodites at the time when size measurements were obtained (i.e. June 2000). This analysis checks whether inbreeding depression on survival to reproduction eliminates weak individuals in treatment 1 and thus

diminishes inbreeding depression on size. These analyses showed no significant differences between treatments for the Pompignan, La Borie and Courège populations, and a significantly (d.f. = 1,  $\chi^2 = 4.65$ ,  $P < 0.05$ ) lower survival rate of selfed offspring in the Tourrière population.

#### Discussion

By controlling for the level of outcrossing on plants of *Thymus vulgaris* from diverse populations we detected two strong patterns of variation in offspring performance. First, in an environment similar to that of phenolic populations in the wild, offspring whose maternal or paternal origin was from a population where phenolic chemotypes predominate showed significantly improved performance relative to those from non-phenolic populations. Secondly, the progeny of hermaphrodites appear to have inferior performance compared with those from females as a result of inbreeding depression and, even in the absence of inbreeding effects, as a result of costs associated with male fertility genes. We conclude that there is a need to establish the link between such issues in order to better understand the causes of performance variation in plant populations.

#### MONOTERPENE-MEDIATED LOCAL ADAPTATION AND OUTBREEDING DEPRESSION

We detected significant differences in the survival and size of  $G_2$  offspring in relation to maternal and paternal origin of  $G_1$  parents. Our experiment was conducted in an environment whose climate and soil more closely resemble that of the two phenolic populations (Tourrière and Pompignan) than the non-phenolic populations (Courège and La Borie). The latter occur within the St Martin-de-Londres valley, where winters are colder due to a temperature inversion and soils are less stony, deeper and probably more humid than at the Pompignan-haut and Tourrière sites, which occur outside of the valley (Gouyon *et al.* 1986; Thompson 2002). The site where our study was conducted is an open field in the region where plants would normally have a phenolic chemotype; the Tourrière population, which only contains phenolic plants (Thompson *et al.* 2003), is the closest population to the study site.

Our results show that progeny from maternal parents from non-phenolic populations (in particular the



Courège population) have reduced performance (survival and size) in our study site compared with plants from phenolic populations. The fact that plants from phenolic populations perform better in an environment that resembles sites where phenolic plants are normally found suggests either very close linkage of genes causing tolerance to climatic/soil conditions or monoterpene-mediated adaptation to local environmental conditions. To confirm whether the patterns we detected are due to local adaptation we have begun studies of survival and growth of (a) replicated cuttings of plants of known chemotype grown in this same open field and in a different garden environment in a region where non-phenolic chemotypes predominate, and (b) seedlings of different maternal origins reciprocally transplanted into different natural sites where either phenolic or non-phenolic chemotypes predominate. Preliminary results confirm our proposition that local adaptation of chemotypes occurs (J.D. Thompson, unpublished data).

It is also possible that phenolic chemotypes have a generally enhanced vigour compared with non-phenolic chemotypes. Phenolic chemotypes have an oil with a lower percentage of the dominant monoterpene than non-phenolic chemotypes (except thuyanol) due to the presence of high levels of precursors in the oil (Thompson *et al.* 2003), hence they may incur lower costs of monoterpene production. In this context it is important to note that the plants from the Courège population were the smallest in size. In this population the majority chemotypes are the thuyanol and linalool forms. The former produces an essential oil in which two to four monoterpenes are the principal constituents (Granger & Passet 1973; Thompson *et al.* 2003). Producing multiple monoterpenes may be more costly than a single monoterpene.

A third potential reason for the greater vigour of plants from phenolic populations is that phenolic chemotypes are frequently better defended against herbivores such as *Helix aspersa* (Linhart & Thompson 1995, 1999), more resistant to microorganisms (Simeon de Bouchberg *et al.* 1976), more inhibitive of seed germination by associated species (Tarayre *et al.* 1995) and less infected by specialist galling flies (J. Amiot, unpublished data). However, we observed no signs of significant herbivory or pathogen attack on the study plants.

An interesting twist to the variation in performance among populations is that significant variation among populations in size and survival was detected in each pollination treatment except for the offspring produced by among-population crosses. In *T. vulgaris*, because of the genetic control of monoterpene production (Vernet *et al.* 1986), within-population crosses will tend to cause offspring to have the chemotype present in that population. In contrast, if crosses among populations involve different chemotypes, phenolic and non-phenolic maternal parents will produce offspring with either or both phenolic or non-phenolic

chemotype depending on the origin of the pollen donor. Our results show a clear pattern in this context. Offspring sired by pollen donors from non-phenolic populations were significantly smaller than those sired by pollen donors from phenolic populations. This result, along with the generally better performance of the progeny from maternal families sampled from phenolic populations, supports the idea of local adaptation, as in the study environment (where phenolic chemotypes would be expected to perform better) phenolic pollen donors sired more vigorous offspring than did non-phenolic pollen donors.

This result has important implications for our understanding of the maintenance of chemotype differentiation that occurs on a very localized scale; the shift from 0 to 100% of phenolic/non-phenolic chemotypes repeatedly occurs over less than 3 km in the study area (Vernet *et al.* 1977a,b; Gouyon *et al.* 1986; Thompson 2002). Populations with two chemotypes are common, but only very rarely do they contain one non-phenolic and one phenolic chemotype, which primarily occur in an intermediate zone between pure phenolic and pure non-phenolic populations (Thompson 2002). Along the sharp cline in chemotype frequencies where we sampled the four populations differentiation in allozyme genes is low ( $F_{ST}$  values < 0.06), suggesting that gene flow (Tarayre & Thompson 1997), primarily by pollen movement (Tarayre *et al.* 1997), may occur among phenolic and non-phenolic populations. Selection on genes determining chemotype is thus likely to be strong.

The results of the present study suggest that any pollen flow among populations adapted to different environments will be accompanied by reduced offspring performance. In contrast, pollen flow among adjacent populations adapted to a common environmental factor will not cause such reduced performance. An overall comparison of progeny performance after outcrossing among populations (treatment 4) and within populations (treatment 3) shows no general effect of increased outcrossing distance (Fig. 1). However, precise identification of the chemotype of the pollen donor shows reduced performance after outcrossing among populations using a non-phenolic pollen donor (Fig. 2). Reduced performance after outcrossing among populations or among spatially separated parents within populations has been reported in previous studies where the pattern is interpreted as evidence for 'outbreeding depression' (e.g. Price & Waser 1979; Parker 1992; Waser *et al.* 2000; Quilichini *et al.* 2001). In such studies a decline in offspring performance after outcrossing has been shown, but the precise genetically controlled traits and their role in local adaptation has not previously been revealed. Our results highlight a potential role of particular genes (for monoterpene production) in the potential expression of local adaptation (of chemotypes) to particular environmental conditions, and the creation of a pattern in progeny performance similar to that of previous studies.

PERFORMANCE VARIATION AMONG  
OFFSPRING FROM HERMAPHRODITES

The progeny of hermaphrodites show significant variation due to differences in performance that are related to degree of inbreeding. Inbreeding depression is a potent force influencing the evolution of sexual polymorphisms in plants (Barrett & Harder 1996; Charlesworth 1999). In gynodioecious species, the selfed offspring of hermaphrodites commonly show significant inbreeding depression (Kohn 1988; Shykoff 1988; Sakai *et al.* 1989; Ashman 1992; Johnston 1992; Molina-Freaner & Jain 1993; Schultz & Ganders 1996; Sakai *et al.* 1997; Del Castillo 1998), which may thus contribute to the maintenance of females.

The present work, combined with previous studies (Assouad *et al.* 1978; Perrot *et al.* 1982; Thompson *et al.* 1998; Thompson & Tarayre 2000), shows that in *Thymus vulgaris* inbreeding depression can significantly reduce the performance of the progeny of hermaphrodites, even in populations with significant rates of natural inbreeding. This supports previous work in which prior inbreeding was not found to influence inbreeding depression in other gynodioecious species (Mutikainen & Delph 1998) and non-gynodioecious species (e.g. Johnston & Schoen 1996). In our study, significant levels of inbreeding in the Tourrière and La Borie populations are not associated with reduced inbreeding depression, despite the fact that inbreeding depression showed evidence of genetic variation among families. This may occur because the inbreeding depression incurred by perennial plants such as thyme may be caused by mildly deleterious alleles (Husband & Schemske 1996). In *T. vulgaris* populations, females will thus have an outcrossing advantage, which may contribute to the maintenance of gynodioecy in populations where hermaphrodites incur high selfing rates. However, in the light of the results discussed in the previous section, this outcrossing advantage will depend on the right combination of maternal and paternal chemical genes and the local environment.

Even in the absence of inbreeding effects, the performance of offspring from hermaphrodites was in some cases significantly poorer than that of females; again this was not consistent among populations (hence the significant interaction between maternal sex and population). This variation shows a clear pattern among populations: in the Pompignan and La Borie populations (where sex ratios are hermaphrodite biased) the offspring from hermaphrodites were larger than the offspring of females, whereas in the Courège and Tourrière populations (where sex ratios are female biased) the offspring from females were larger than those from hermaphrodites (see Fig. 1b). This pattern is due to variation among the progeny of hermaphrodites, which show on average twice as much variation in size than do the progeny of females. Hermaphrodites are also more variable than females in terms of their seed production, even in the absence of selfing, (Thompson

& Tarayre 2000) and show genetic variation in pollen production per flower (Atlan *et al.* 1992).

In general terms, outcrossed females may produce superior offspring to outcrossed hermaphrodites for several reasons. First, females may reallocate resources not used in pollen production to seeds (Ashman 1992; Eckhart 1992). This is highly probable in *T. vulgaris* as even outcrossed hermaphrodites do not produce as many seeds as outcrossed females (Thompson & Tarayre 2000). Secondly, three genetic reasons can also contribute to this pattern (Delph & Mutikainen 2003): greater gametophytic selection in female flowers, cytoplasmic gene variation and negative pleiotropic effects of nuclear restorer alleles (or closely linked genes). In thyme, female flowers do not have a longer style nor do they remain open longer than female-phase hermaphrodite flowers, hence the gametophytic selection hypothesis is unlikely to influence performance variation. In our experiment, in each family female and hermaphrodite maternal parents and their offspring share the same cytoplasmic genome, and we used the same families for each maternal sex, hence different amounts of variation among maternal families in the performance of the progenies of the two maternal sex phenotypes can not be attributed to maternal cytoplasm differences. In contrast, in a given maternal family, although hermaphrodites and females are likely to have roughly the same complement of restorer alleles for other cytoplasmic types, hermaphrodites also have the restorer gene for the cytoplasmic genome they contain. The greater variation in performance across maternal families of the progeny of hermaphrodites could thus be due to differences in how restorer genes interact with maternal cytoplasm.

Pleiotropic costs of restorer alleles when present with cytoplasmic types they do not restore have been predicted to represent a key component of among-genotype fitness variation and the maintenance of nucleo-cytoplasmic polymorphism in gynodioecious species (Van Damme 1984; Gouyon *et al.* 1991). Experimental study of this 'cost of restoration' has provided some evidence that it may exist (see Koelewijn 1996; de Haan *et al.* 1998; Bailey 2002; Delph & Mutikainen 2003). Recent theoretical (Bailey *et al.* 2003) and empirical (Delph & Mutikainen 2003) studies suggest that this cost may also occur when the nuclear restorer genes are expressed, and not just when there is a mismatch of nuclear and cytoplasmic genes. The variation we observed among the progeny of hermaphrodites may to some degree be related to how male fertility genes impact on the performance of plants when present in some cytoplasmic backgrounds. Performance variation among the progeny of hermaphrodites may thus depend not only on rates of selfing and inbreeding depression but also on the combination of restorer genes and maternal cytoplasm.

## Conclusions

We have shown here that the diverse genetic aspects of sexual and chemical polymorphisms jointly influence

plant performance in *Thymus vulgaris*. Both inbreeding depression in the self-compatible hermaphrodites and reduced performance after outcrossing among populations due to local adaptation of chemical genes can potentially occur. Between these two extremes of the outcrossing gradient, variation in progeny performance may be influenced by genes that determine sex expression. Previous work on the latter issue has often used among-population crosses to examine variation among progeny in terms of sex ratio (Couvét *et al.* 1985) and plant performance (Gigord *et al.* 1999). The present work shows that to understand such performance variation requires knowledge of not only the genetic constitution of parents in terms of their sex-related genes but also their chemotype-determining genes. We thus emphasize the need to consider diverse genetic effects in order to fully evaluate the causes of performance variation among plant populations.

### Acknowledgements

We thank G. Loucougury, M. Giberneau, S. Vinsot, C. Collin, D. Degueldre and S. Janot for practical help and B. Ehlers, H. Prentice and three anonymous reviewers for comments on preliminary versions of the manuscript. This work was funded by: (i) contract ACC SV3 N°9503025 from the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Insertion Professionnelle (JDT); (ii) the 'Appel d'offre du B.R.G. 1999/2000 – projet 42' (JDT); and (iii) N.S.F. grant DEB-0091385 (YBL).

### References

- Affre, L. & Thompson, J.D. (1999) Variation in levels of self-fertility, inbreeding depression and levels of inbreeding in four *Cyclamen* species. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 113–122.
- Agren, J. & Schemske, D.W. (1993) Outcrossing rate and inbreeding depression in two annual monoecious herbs, *Begonia hirsuta* and *B. semiovata*. *Evolution*, **47**, 125–135.
- Ashman, T.-L. (1992) The relative importance of inbreeding and maternal sex in determining progeny fitness in *Sidalcea oregana* ssp. *spicata*, a gynodioecious plant. *Evolution*, **46**, 1862–1874.
- Assouad, M.W., Dommée, B., Lumaret, R. & Valdeyron, G. (1978) Reproductive capacities in the sexual forms of the gynodioecious species *Thymus vulgaris* L. *Biology Journal of the Linnean Society*, **77**, 29–39.
- Atlan, A., Gouyon, P.-H., Fournial, T., Pomente, D. & Couvet, D. (1992) Sex allocation in an hermaphroditic plant: the case of gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology*, **5**, 189–203.
- Bailey, M.F. (2002) A cost of restoration of male fertility in a gynodioecious species, *Lobelia siphilitica*. *Evolution*, **56**, 2178–2186.
- Bailey, M.F., Delph, L.F. & Lively, C.M. (2003) Modelling gynodioecy: novel scenarios for maintaining polymorphism. *American Naturalist*, **161**, 762–776.
- Barrett, S.C.H. & Harder, L.D. (1996) Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 73–79.
- Bell, G. & Lechowicz, M.J. (1991) The ecology and genetics of fitness in forest plants. I. Environmental heterogeneity measured by explant trials. *Journal of Ecology*, **79**, 663–685.
- Bretagnolle, F. & Thompson, J.D. (2001) Phenotypic plasticity in sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata* L. *International Journal of Plant Science*, **162**, 309–316.
- Charlesworth, D. (1999) Theories of the evolution of dioecy. *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (eds M.A. Geber, T.E. Dawson & L.F. Delph), pp. 33–60. Springer-Verlag, Berlin.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 237–268.
- Couvét, D., Gouyon, P.-H., Kjellberg, F. & Valdeyron, G. (1985) La différenciation nucleo-cytoplasmique entre populations: une cause de l'existence de males-steriles dans les populations naturelles de thym. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, **300**, 665–668.
- Couvét, D., Ronce, O. & Gliddon, C. (1998) The maintenance of nucleocytoplasmic polymorphism in a metapopulation: the case of gynodioecy. *American Naturalist*, **152**, 59–70.
- Del Castillo, R.F. (1998) Fitness consequences of maternal and non-maternal components of inbreeding in the gynodioecious *Phacelia dubia*. *Evolution*, **52**, 44–60.
- Delph, L.F. (1999) Sexual dimorphism in life history. *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (eds M.A. Geber, T.E. Dawson & L.F. Delph), pp. 149–173. Springer-Verlag, Berlin.
- Delph, L.F. & Mutikainen, P. (2003) Testing why the sex of the maternal parent affects seedling survival in a gynodioecious species. *Evolution*, **57**, 231–239.
- Dommée, B., Assouad, M.W. & Valdeyron, G. (1978) Natural selection and gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **77**, 17–28.
- Donohue, K. (2002) Germination timing influences natural selection on life-history characters *Arabidopsis thaliana*. *Ecology*, **83**, 1006–1016.
- Eckhart, V.M. (1992) Resource compensation and the evolution of gynodioecy in *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Evolution*, **46**, 1313–1328.
- Ehlers, B. & Thompson, J.D. (2004) Hermaphrodite sex allocation varies seasonally with the availability of females in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Journal of Ecology*, **92**, 15–23.
- Escarré, J., Lepart, J., Sans, F.X., Santuc, J.J. & Gorse, V. (1999) Effects of herbivory on the growth and reproduction of *Picris hieracioides* in the Mediterranean region. *Journal of Vegetation Science*, **10**, 101–110.
- Gigord, L., Lavigne, C., Shykoff, J.A. & Atlan, A. (1999) Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gynodioecious species *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 596–604.
- Gouyon, P.H., Vernet, P., Guillermin, J.L. & Valdeyron, G. (1986) Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Heredity*, **57**, 59–66.
- Gouyon, P.-H., Vichot, F. & Van Damme, J.M.M. (1991) Nuclear-cytoplasmic male sterility: single-point equilibria versus limit cycles. *American Naturalist*, **137**, 498–514.
- Granger, R. & Passet, J. (1973) *Thymus vulgaris* L. spontané de France: races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry*, **12**, 1683–1691.
- de Haan, A.A., Koelewijn, H.P., Hunscheid, M.P.J. & van Damme, J.M.M. (1998) The dynamics of gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Mode of action and frequencies of restorer alleles. *Genetics*, **147**, 1317–1328.
- Husband, B.C. & Schemske, D.W. (1996) Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, **50**, 54–70.
- Johnston, M.O. (1992) Effects of cross and self-fertilization on progeny fitness in *Lobelia cardinalis* and *L. siphilitica*. *Evolution*, **46**, 688–702.

- Johnston, M.O. & Schoen, D.J. (1996) Correlated evolution of self-fertilization and inbreeding depression: an experimental study of nine populations of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution*, **50**, 1478–1491.
- Koelewijn, H.P. (1996) Sexual differences in reproductive characters in gynodioecious *Plantago coronopus*. *Oikos*, **75**, 443–452.
- Kohn, J.R. (1988) Why be female? *Nature*, **335**, 431–433.
- Linhart, Y.B. & Thompson, J.D. (1995) Terpene-based selective herbivory by *Helix aspersa* (Mollusca) on *Thymus vulgaris* (Labiatae). *Oecologia*, **102**, 126–132.
- Linhart, Y.B. & Thompson, J.D. (1999) Thyme is of the essence: biochemical variability and multi-species deterrence. *Evolutionary Ecology Research*, **1**, 151–171.
- Mazer, S.J. & Gorchov, D.L. (1996) Parental effects on progeny phenotype in plants: distinguishing genetic and environmental affects. *Evolution*, **50**, 44–53.
- McCrea, K.D., Abrahamson, W.G. & Weis, A.E. (1985) Goldenrod ball gall effects on *Solidago altissima*: <sup>14</sup>C translocation and growth. *Ecology*, **66**, 1902–1907.
- Molina-Freaner, F. & Jain, S.K. (1993) Inbreeding effects in a gynodioecious population of the colonizing species *Trifolium hirtum* All. *Evolution*, **47**, 1472–1479.
- Mutikainen, P. & Delph, L.F. (1998) Inbreeding depression in gynodioecious *Lobelia siphilitica*: among-family differences override between morph differences. *Evolution*, **52**, 1572–1582.
- Parker, M.A. (1992) Outbreeding depression in a selfing annual. *Evolution*, **46**, 837–841.
- Perrot, V., Dommée, D. & Jacquard, P. (1982) Etude expérimentale de la concurrence entre individus issus d'autofécondation et d'allofécondation chez le thym (*Thymus vulgaris* L.). *Acta Oecologica – Oecologia Plantarum*, **3**, 171–184.
- Petit, C. & Thompson, J.D. (1997) Variation in the phenotypic response to light availability between diploid and tetraploid populations of the perennial grass *Arrhenatherum elatius* from open and woodland sites. *Journal of Ecology*, **85**, 657–667.
- Price, M.V. & Waser, N.M. (1979) Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. *Nature*, **277**, 294–297.
- Quilichini, A., Debussche, M. & Thompson, J.D. (2001) Evidence for local outbreeding depression in the Mediterranean island endemic *Anchusa crispa* Viv. (Boraginaceae). *Heredity*, **87**, 190–197.
- Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Sakai, A.K., Karoly, K. & Weller, S.G. (1989) Inbreeding depression in *Schiedea globosa* and *S. salicaria* (Caryophyllaceae), subdioecious and gynodioecious Hawaiian species. *American Journal of Botany*, **76**, 437–444.
- Sakai, A.K., Weller, S.G., Chen, M.-L., Chou, S.Y. & Tسانونت, C. (1997) Evolution of gynodioecy and maintenance of females: the role of inbreeding depression, outcrossing rates, and resource allocation in *Schiedea adamantis* (Caryophyllaceae). *Evolution*, **51**, 724–736.
- SAS (2001) *SAS/STAT Users Guide*. SAS, Cary, North Carolina.
- Schmitt, J., Eccleston, J. & Ehrhardt, D.W. (1987) Dominance and suppression, size dependent growth and self-thinning in a natural *Impatiens capensis* population. *Journal of Ecology*, **75**, 651–665.
- Schultz, S.T. & Ganders, F.R. (1996) Evolution of unisexuality in the Hawaiian flora: a test of microevolutionary theory. *Evolution*, **50**, 842–855.
- Shykoff, J.A. (1988) Maintenance of gynodioecy in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae): stage-specific fecundity and viability selection. *American Journal of Botany*, **75**, 844–850.
- Simeon de Bouchberg, M., Allegrini, J., Bessiere, C., Attisso, M., Passet, J. & Granger, R. (1976) Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris* Linnaeus. *Estratto Dalla Rivista Italiana Essenze, Profumi, Piante Officinali, Aromi, Saponi, Cosmetici, Aerosol*, Vol. 58, pp. 527–536.
- Tarayre, M. & Thompson, J.D. (1997) The population genetic structure of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *Journal of Evolutionary Biology*, **10**, 157–174.
- Tarayre, M., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., Couvet, D. & Thompson, J.D. (1997) The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *American Journal of Botany*, **84**, 1675–1684.
- Tarayre, M., Thompson, J.D., Escarré, J. & Linhart, Y.B. (1995) Intra-specific variation in the inhibitory effects of *Thymus vulgaris* (Labiatae) monoterpenes on seed germination. *Oecologia*, **101**, 110–118.
- Thompson, J.D. (2002) Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphism in thyme. *Thyme: the Genus Thymus* (eds E. Stahl-Biskup & F. Saez), pp. 44–74. Taylor & Francis, London.
- Thompson, J.D., Chalchat, J.-C., Michet, A., Linhart, Y.B. & Ehlers, B. (2003) Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 859–880.
- Thompson, J.D., Manicacci, D. & Tarayre, M. (1998) Thirty five years of thyme: a tale of two polymorphisms. *Bioscience*, **48**, 805–815.
- Thompson, J.D., McNeilly, T. & Gray, A.J. (1991a) Population variation in *Spartina anglica* C.E. Hubbard. II. Reciprocal transplants among three successional populations. *New Phytologist*, **117**, 129–139.
- Thompson, J.D., McNeilly, T. & Gray, A.J. (1991b) Population variation in *Spartina anglica* C.E. Hubbard. III. Response to substrate variation in a glasshouse experiment. *New Phytologist*, **117**, 141–152.
- Thompson, J.D., McNeilly, T. & Gray, A.J. (1993) The demography of clonal plants in relation to successional habitat change: the case of *Spartina anglica*. *Primary Succession on Land*, Volume 12 (eds J. Miles & D.W.H. Walton), pp. 193–207. Blackwell Scientific, Oxford.
- Thompson, J.D., Rolland, A.-G. & Prugnolle, F. (2002) Genetic variation for sexual dimorphism in flower size within and between populations of gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Journal of Evolutionary Biology*, **15**, 362–372.
- Thompson, J.D. & Tarayre, M. (2000) Exploring the genetic basis and proximate causes of variation in female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution*, **54**, 1510–1520.
- Van Damme, J.M.M. (1984) Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. V. Frequencies and spatial distribution of nuclear and cytoplasmic genes. *Heredity*, **56**, 355–364.
- Weiner, J. (1988) The influence of competition on plant reproduction. *Plant Reproductive Ecology* (eds J. Lovett Doust & L. Lovett Doust), pp. 228–245. Oxford University Press, Oxford, Oxford.
- Vernet, P., Gouyon, P.H. & Valdeyron, G. (1986) Genetic control of the oil content in *Thymus vulgaris* L.: a case of polymorphism in a biosynthetic chain. *Genetica*, **69**, 227–231.
- Vernet, P., Guillermin, J.L. & Gouyon, P.H. (1977a) Le polymorphisme chimique de *Thymus vulgaris* L. (Labiée) I. Repartition des formes chimiques en relation avec certains facteurs écologiques. *Oecologia Plantarum*, **12**, 159–179.
- Vernet, P., Guillermin, J.L. & Gouyon, P.H. (1977b) Le polymorphisme chimique de *Thymus vulgaris* L. (Labiée) II. Carte à l'échelle 1/25 000 des formes chimiques dans la région de Saint-Martin-de-Londres (Hérault-France). *Oecologia Plantarum*, **12**, 181–194.
- Waser, N.M., Price, M.V. & Shaw, R.G. (2000) Outbreeding depression varies among cohorts of *Ipomopsis aggregata* planted in nature. *Evolution*, **54**, 485–491.

Received 17 May 2003  
revision accepted 22 October 2003

**"Gender variation and primary succession  
in a tropical pioneer woody species *Antirhea borbonica*"**

Litrice, T. Pailler, J.D. Thompson

Manuscrit soumis à Journal of Ecology

Gender variation and primary succession in a tropical pioneer woody species,  
*Antirhea borbonica*

ISABELLE LITRICO <sup>1,2</sup>, THIERRY PAILLER <sup>1</sup> AND JOHN D. THOMPSON <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *UMR C53 Peuplements végétaux et bioagresseurs en milieu tropical, CIRAD - Université de  
La Réunion, 7 Chemin de L'Irat, 97417 Saint Pierre, La Réunion*

<sup>2</sup> *UMR 5175 Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 Route de Mende,  
34293 Montpellier cedex 5, France*

Corresponding author: Isabelle Litrico

Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 Route de Mende, 34293

Montpellier cedex 5, France

E-mail: [isabelle.litrico@cefe.cnrs-mop.fr](mailto:isabelle.litrico@cefe.cnrs-mop.fr)

Tel: 00 33 4 67613424

Fax: 00 33 4 67412138

**Keywords:** Colonisation, dioecy, island, plasticity, resources

## Summary

1 Sexual studies report how gender specialisation is favoured in unisexual plants in resource-limited conditions.

2 In this study we quantify gender variation among populations of *Antirhea borbonica*, a pioneer woody species on young lava flows, which maintains populations into later stages of primary succession on the volcanic island of La Réunion. In addition, we experimentally manipulate resource levels in a natural population to test whether environmental conditions limit growth and maternal fertility.

3 Two floral morphs can be identified: females, with small flowers, an exerted style, concealed anthers, and almost-zero pollen production, and polliniferous plants with larger flowers, a concealed style and anthers with viable pollen at the mouth of the corolla tube.

4 The polliniferous morph shows significant gender variation, from almost-zero fruit production in pioneer populations to high fruit set, albeit less than females, in late-succession. Repeated observations over four years showed that most polliniferous plants can produce fruits, even in pioneer populations, where individual trees do not produce fruits every year.

5 Seeds and seedlings produced by the polliniferous morph had significantly lower viability than those from females. Seeds of females in late-succession populations were significantly larger and germinated better than those in pioneer populations.

6 A significant increase in fruit production by the polliniferous morph was observed after two years of resource supplementation in a pioneer population.

7 These results indicate that resource limitation favours dioecy in pioneer populations, while in late-succession, where resources are more probably abundant and trees larger and older, the sexual system resembles subdioecy. The patterns of variation support the idea that gender variation in this long-lived species is due to plasticity of individual trees in temporally heterogeneous habitats.

## Introduction

Stressful ecological conditions can have a strong effect on a range of reproductive traits in plant populations. For instance, several studies have reported a greater incidence of gender dimorphism (Costich 1995; Humeau *et al.* 1999; Case & Barrett 2001; 2004) and increased gender specialisation in gynodioecious species (Delph 1990a; Barrett 1992; Wolfe & Shmida 1997; Ashman 1999) in resource-limited habitats. These empirical studies provide evidence for the prediction (Charnov 1982; Charlesworth 1999) that unisexuality and gender dimorphism should be favoured over hermaphroditism (monomorphism) as a result of sexual specialisation where resources limit sexual reproduction.

Variation in sexual systems among populations have however been documented in only a few species (see Case & Barrett 2004 for a review), making it difficult to fully evaluate the role of habitat conditions for the evolution of sexual specialisation and gender dimorphism. An important issue here concerns the relative role of (a) genetic differentiation among populations and the establishment of males and females in populations of cosexual plants and (b) phenotypic plasticity of gender which may allow individual plants to shift gender in relation to local environmental conditions. The possibility of gender plasticity is of primary importance given the large number of dioecious species which are long-lived shrubs or trees in many regions, especially the tropics (Bawa 1980; Herrera 1982; Aronne & Wilcock 1994; Renner & Ricklefs 1995; Sakai *et al.* 1995).

An ecological setting where resource variation may have a strong effect on plant reproduction concerns vegetation development in primary succession. In the early stages of primary succession, pioneer plants usually establish in a highly stressful environment (see discussion by Miles & Walton 1993). Later in succession, competitive interactions gain in importance and environmental stress decreases. Gray (1993) and Thompson *et al.* (1993) have argued for an important role of phenotypic plasticity in trait variation along the gradient of



primary succession, particularly in perennial pioneer species which maintain populations in later successional stages.

A particularly pertinent example of primary succession concerns the case of volcanic eruptions which produce lava flows that cause population extinction and open new sites for colonisation in the surrounding landscape (e.g. Wood & del Moral 1987; Drake & Muller-Dombois 1993; Thébaud & Strasberg 1997). This situation creates a gradient of primary succession from newly formed lava flows to late-succession and climax forest. This gradient is associated with resource variation among habitats at different points of the succession. In the initial stages of vegetation succession, plants establish on barren substrates where there is little soil, run-off and percolation are rapid, and available organic and nitrogenous compounds often occur in very small amounts (Del Moral 1993). Such resource limitation is likely to be attenuated as succession proceeds. The matrix of populations in the landscape is thus associated with strong environmental gradients which may contribute to reproductive trait variation. However, to our knowledge, the potential importance of gender plasticity of long-lived species in relation to resource availability during primary succession has not yet been studied.

On the island of La Réunion (Indian Ocean), vegetation colonisation on different-aged lava flows on the slopes of the Piton de la Fournaise volcano has produced a chronosequence of primary succession. Currently all lava flows occur on the east flank of the caldera in the zone known as the "*Grand Brûlé*". In this area, the natural lowland tropical rain forest occurs as fragmented pockets of habitat in a landscape of recent lava flows, whose ages are well-known due to the high frequency of lava flows in the last 100 years (Strasberg 1994). The *Grand Brûlé* site provides an ideal setting for the study of population variation in relation to colonisation and succession: the lava flows are chemically similar, occur in the same climatic zone, their ages are well documented and they do not contain a seed bank when they are

created. The establishment of species on the lava flows thus requires dispersal and occurs in similar environmental conditions in different sites. The main environmental differences among sites are thus associated with vegetation succession.

In this paper we quantify variation in reproductive traits along a gradient of primary succession, and experimentally test whether any variation is due to resource limitation, for the pioneer woody species *Antirhea borbonica* J.F. Gmel (Rubiaceae) on La Réunion, a species which also persists into late-succession (Strasberg 1994). Although this species has been suggested to be dioecious (Verdcourt *et al.* 1989), preliminary observations indicate that males may often produce small numbers of fruits, although females do not produce pollen (J.D. Thompson and T. Pailler, pers. obs.). We will thus refer to the two sexual phenotypes as "polliniferous" and "female" respectively. Our overall objective is to quantify gender variation in the two sexual phenotypes in relation to the successional status of populations and to test whether such variation is associated with resource limitation. We ask the following questions: (1) Do the two sexual phenotypes show a consistent floral or vegetative dimorphism among populations? (2) Is sex expression variable among populations? (4) Is seed derived from the polliniferous morph similar in biomass and germination capacity compared to seed from females? (3) Does resource limitation in pioneer populations contribute to gender variation?

## Methods

### STUDY SPECIES AND SITES

*Antirhea borbonica* is endemic to La Réunion and Mauritius. It is an abundant pioneer woody species on young lava flows, once they reach ~25 years of age, persists through different successional stages and maintains populations in climax rain forest (Strasberg 1995). Trees in older forests may be more than 100 years old. *A. borbonica* produces small, tubular, white flowers which are visited by a range of insects (Lepidoptera, Diptera and Hymenoptera) and

fleshy fruits which are dispersed by birds, mostly native *Zosterops* spp. and introduced *Pycnonotus jocosus* (T. Pailler pers. obs.). Each fruit contains one seed that is enclosed in an endocarp.

We chose to work at twelve sites on La Réunion and one site on Mauritius (Table 1). On La Réunion, eight of these populations occur in the *Grand Brûlé* at <400m elevation, in a highly disturbed landscape where population extinction and re-colonisation are frequent. Sites 1-6 contain populations in pioneer vegetation on lava flows which occurred in the last 100 years, and sites 7-8 in fragments of forest which are less than 300 years old. Four populations occur outside of the *Grand Brûlé* in less fragmented climax forest. One population (site 9) occurs in the only remaining piece of natural lowland rain forest outside of the *Grand Brûlé* on La Reunion in the Mare Longue nature reserve (~300m elevation). The three remaining populations occur at 1000-1500m elevation outside of the active caldera at the altitudinal limits of the distribution of *A. borbonica* on La Réunion. They occur in either semi-dry tropical forest (site 10), mid-elevation tropical forest (site 11) or tropical cloud forest (site 12) and thus cover the range of the distribution of this species across the island and in different forest types. In addition, we were able to sample one small population in the Pétrin natural reserve on Mauritius.

#### REPRODUCTIVE TRAITS

In January-February 2001, three flowers per tree were randomly collected on 10-20 individuals of each morph in the C43b, C19, KP1, MAL, DOD, BEB and MAU populations to measure corolla length, style length and anther height. Measures were made with digital callipers to 0.01mm. Mean values were calculated for each individual plant. In October 2002, three flowers were randomly collected on 10 trees of each morph in C43b and MAL populations to quantify the number of pollen grains (based on 2-3 replicate observations of a

single dehiscent anther per flower), the number of ovules per flower (counted under an optical microscope) and the proportion of open stigmas per plant.

Between October 2003 and April 2004 we collected data on vegetative size and flower and fruit production in all 12 study populations on La Réunion. We measured the diameter (1.30m DBH), height, width and number of branches on a total of 852 trees from the following populations: C61 (n=82), C43a (n=90), C43b (n=136), C43c (n=60), C31 (n=30), C19 (n=104), KP1 (n=134), KP2 (n=30), MAL (n=84), CIL (n=30), BEB (n=67) and DOD (n=65). In these populations in 2004 and in 9 populations (C43a, C43b, C43c, C19, KP1, MAL, CIL, DOD and BEB) in 2003, we determined the sex-ratio (male number / female number). From 15-20 individuals of each morph in these twelve populations, we determined the mean number of inflorescences per node (10-20 nodes per tree) and the mean number of flowers and fruit per inflorescence (5-10 inflorescences per tree). These measures were also made in the three preceding years in the C43b, C19, KP1 and MAL populations, and the two preceding years in the DOD and BEB populations. Where possible the same individuals were sampled each year (each tree was labelled with metal tag in the first year of study).

In February 2004 and in January/February 2001, 2002 and 2003 in the MAL population, we estimated mean seed mass on 15-20 females and 8-14 plants of the polliniferous morphs which set fruit. For each individual, seed mass was determined as the mean mass of five to ten seeds. The estimation of seed mass on polliniferous plants was only done in this population due to the very low number of mature fruits on polliniferous plants in the other populations.

Using seeds produced in the MAL population in 2002, seed germination was quantified in greenhouse conditions at the CEFÉ-CNRS experimental gardens in Montpellier (southern France). In March 2002, 20 seeds from each of 15 female trees and 8-20 seeds from eight trees of the polliniferous morph (the mean seed mass of five seeds was determined for

each individual) were sown, 10 seeds per pot (15 x 8 cm), in a mixture of 1/3 sand and 2/3 garden soil. Pots were arranged in a single randomised block in a temperature controlled greenhouse (25 - 27° C and 90 % humidity). Seed germination and seedling mortality were recorded weekly for ten weeks (after which no further seed germination was observed). In July, three seedlings from each maternal plant were individually potted in the same potting compost and their height measured monthly till February 2003.

#### EXPERIMENTAL RESOURCE SUPPLEMENTATION

A resource supplementation experiment was carried out from September 2001 to March 2004 in the C43b population (n=60) and from September 2002 to March 2004 in the MAL population (n=40). Ten trees of each sexual phenotype were randomly allocated to one of three treatments: resource supplementation, control and defoliation trees. In the resource supplementation treatment, 100g of NPK fertilizer (solid granules) were sprinkled monthly under the canopy. In October 2002, in the C43b population, 10 individuals of each sex phenotype were defoliated by removing a number of leaves equivalent to the increase in leaf number observed in the resource supplementation experiment relative to controls during the previous year. We quantified the number of inflorescences per node on 10 randomly sampled nodes and the number of flowers and fruits per inflorescence on 10 randomly sampled inflorescences monthly. We also quantified vegetative growth of fertilized and control individuals in C43b population from October 2001 to May 2002. To do so, we randomly marked a single node (with coloured-coded scotch tape) on each of three branches per tree and noted monthly increases in the number of nodes per branch.



## DATA ANALYSES

All data analyses were conducted using SAS (2001). Vegetative traits (diameter, height, width, branch number), and floral traits (corolla length, style length and anther height), pollen and ovule number per flower, inflorescence number per node, flower number per inflorescence, seed mass and seedling height were analysed in ANOVA using PROC GLM. Population, sex and their interaction were treated as fixed effects and data were log or square root transformed where necessary to satisfy ANOVA assumptions. To evaluate differences among populations, pair-wise means comparisons (lsmeans) were made with the Bonferroni significance level adjustment. This type of analysis was used as a basis for all comparisons described as being significant in the results section. In the analyses of inflorescence number per node, an estimation of vegetative size (diameter \* height \* width \* number of branches / 4) was included as a covariate. We analysed differences in the sex-ratio among populations using heterogeneity  $G^2$  tests.

The proportion of open stigmas, fruit set (fruit number / flower number per inflorescence), the proportion of inflorescences per tree and the proportion of individuals in a population bearing fruit were analysed using PROC GENMOD, with population, sex and their interaction as fixed effects. To analyse seed germination, PROC GENMOD was used to test for variation among populations and for variation between sexual phenotypes. In the analyses of seed germination, mean seed mass of the maternal parent was included as a covariate.

To test the effect of different resource levels on vegetative growth (node number per branch) and on pollen and ovule number per flower, ANOVA were conducted using PROC GLM, with sex, treatment and their interaction as fixed effects. Three seasons were defined in order to assess flowering and fruit production: (i) season 1, November 2001 to March 2002; (ii) season 2, November 2002 to March 2003; (iii) season 3, November 2003 to March 2004. To test the effect of resource supplementation on inflorescence number per node and the

number of flowers per inflorescence, we used PROC MIXED with the variable "season" incorporated using a heterogeneous covariance matrix (CSH). In this analysis, individual was treated as a random effect in the ANOVA model and sex, treatment, season and their interaction as fixed effects. Data for fruit set and the proportion of inflorescences/individuals with at least one fruit were analysed with PROC GENMOD and Generalized Estimating Equations (GEE) models with a "repeated" statement. Pair-wise means comparisons (Lsmeans) were made with Bonferroni adjustment. In these analyses resource accumulation and time effects are grouped together within the variable "season".

## Results

### SEXUAL DIMORPHISM

The two sexual phenotypes show a clear-cut difference in floral morphology (Fig. 1). Flowers of the polliniferous morph had significantly longer corolla tubes ( $F_{1, 287} = 1650, P < 0.001$ ), with anthers positioned higher in the flower ( $F_{1, 287} = 1864, P < 0.001$ ) and shorter styles ( $F_{1, 287} = 310, P < 0.001$ ) than female flowers. All three traits showed significant variation among populations ( $F_{6, 287} = 4.15, P < 0.001$  for corolla length;  $F_{6, 287} = 5.61, P < 0.001$  for anther height;  $F_{6, 287} = 6.26, P < 0.001$  for style length), but no significant population by sex interaction.

Pollen was almost never produced by female trees in the two studied populations (on average 5 pollen grains per flower in the C43b population and 3 in the MAL population). In both populations, average pollen number per flower of the polliniferous morph (C43b:  $2760 \pm 178$  and MAL:  $3795 \pm 323$ ) was significantly greater than on females ( $F_{1, 37} = 577.92, P < 0.001$ ). The population and interaction effects were not significant. Trees in the MAL population had significantly ( $F_{1, 36} = 4.23, P < 0.05$ ) more ovules per flower (polliniferous morph:  $2 \pm 0.04$  and female:  $2.2 \pm 0.05$ ) than those in the C43b population (polliniferous

morph:  $1.90 \pm 0.06$  and female:  $1.96 \pm 0.02$ ). Ovule number per flower showed no difference between sexual phenotypes and no significant population by sex interaction. The percentage of open stigmas varied from 87-95 % and showed no significant variation among populations or sexual phenotypes.

Sex ratio values (Tab. 2) showed no overall departure from a 1:1 ratio for the 12 studied populations in 2004 ( $df=11$ ,  $G^2 = 5.69$ ,  $P > 0.5$ ) and 2003 ( $df=8$ ,  $G^2 = 7.45$ ,  $P > 0.5$ ). Within populations, the sex ratio values (Tab.2) conformed to a 1:1 ratio in both years, except for BEB population in 2004 and BEB and KP1 in 2003, which had slightly polliniferous morph biased sex ratios.

In 2004, inflorescence number per node showed significant variation among populations ( $F_{11, 335} = 4.94$ ,  $P < 0.001$ ). Sexual phenotype ( $F_{1, 335} = 0.04$ ,  $P > 0.5$ ) and the population by sex interaction ( $F_{11, 335} = 1.73$ ,  $P > 0.05$ ) had no significant effect on inflorescence number. The co-variable (vegetative size) had a significant effect on inflorescence number ( $F_{1, 335} = 15.21$ ,  $P < 0.001$ ). Flower number per inflorescence varied significantly among populations ( $F_{11, 322} = 80.35$ ,  $P < 0.0001$ ) due to a dramatic decline in flower number in the three populations in climax forest distant from the *Grand Brûlé*. The polliniferous morph generally produced more flowers per inflorescence than females ( $F_{11, 322} = 26.19$ ,  $P < 0.001$ ) and there was no significant population by sex interaction for this trait.

There were significant positive correlations among all measured vegetative traits; hence we only analysed variation in trunk diameter, which is used to illustrate the pattern of variation in overall vegetative size. There was no significant variation in trunk diameter among sexual phenotypes ( $F_{1, 709} = 0.02$ ,  $P > 0.5$ ), and no significant sex by population interaction ( $F_{11, 709} = 0.76$ ,  $P > 0.5$ ). Trunk diameter showed significant variation among populations ( $F_{11, 709} = 126$ ,  $P < 0.001$ ), mostly due to a smaller diameter of trees in the early-succession populations.



## MATERNAL FERTILITY

A highly contrasting pattern of fertility variation was observed for the two sexual phenotypes. In 2004, the proportion of the polliniferous morph bearing fruit varied significantly among populations ( $df = 11$ ,  $\chi^2 = 78.08$ ,  $P < 0.001$ ) due to a significant increase in the late-succession populations relative to the early-succession populations (Fig. 2a). Whereas the percentage of trees setting fruit was always  $< 20\%$  in the early succession populations, roughly 50% of the polliniferous plants set fruit in the late-succession populations. The percentage of females setting fruit was consistently close to 100% in all populations. This pattern was similar in each of the four years of study. However, when all four years were grouped together, the proportion of trees of the polliniferous morph setting fruit in the early-succession populations was equivalent to that in the late-succession populations. This result was caused by variation among years in the ability of polliniferous trees to set fruit, which they often did in only one year of the study. In contrast, female trees consistently set fruit during each of the four years of study in all the populations.

Fruit/flower number (fruit set) of the polliniferous morph was also significantly less than females and increased in late-succession (Fig 2b). Fruit set varied significantly among populations ( $df = 11$ ,  $\chi^2 = 3091.68$ ,  $P < 0.001$ ) and sexes ( $df = 1$ ,  $\chi^2 = 12207.7$ ,  $P < 0.001$ ) and showed a population by sex interaction was significant ( $df = 11$ ,  $\chi^2 = 2913.04$ ,  $P < 0.001$ ).

Fruit set of the polliniferous morph was significantly less than that of females in all populations, and the phenotypic gender  $G$  defined as, given a individual  $i$   $G_i = \text{fruit number from } i / [\text{fruit number from } i + (\text{polliniferous flowers number from } i \times E)]$ , with  $E = \sum \text{fruit number from all individuals of population} / \sum \text{polliniferous flower number from all individuals of population}$ , illustrated increasing female function with successional age (Fig. 3).

Whereas fruit set of the polliniferous morph increased in late-succession populations, fruit set of females decreased (Fig. 2b). These differences were generally consistent over the four years of study.

#### SEED SIZE AND SEEDLING PRODUCTION

In the MAL population, seeds produced by polliniferous plants were significantly lighter than those produced by females (Fig. 4) in 2001 ( $F_{1,33} = 10.7$ ,  $P < 0.01$ ), 2003 ( $F_{1,28} = 12.9$ ,  $P < 0.01$ ) and 2004 ( $F_{1,25} = 3.8$ ,  $P < 0.05$ ) but not in 2002 ( $F_{1,23} = 0.03$ ,  $P > 0.5$ ).

Germination of seeds ( $df = 1$ ,  $\chi^2 = 31.9$ ,  $P < 0.001$ ) and seedling survival ( $df = 1$ ,  $\chi^2 = 12.2$ ,  $P < 0.001$ ) were significantly greater in the offspring of females compared to those of the polliniferous morph (respectively: 46% vs 88% and 70% vs 95%). There was no significant difference ( $F_{1,18} = 1.13$ ,  $P > 0.05$ ) in seedling height among progenies from females and polliniferous morphs. When seed germination and seedling survival were included in the ratio of female function (i.e. proportion of individuals bearing fruits\*inflorescence per node\*flower per inflorescence\*fruit number/flower\*seed germination\*seedling survival) of the polliniferous morph relative to females, that the cumulative investment in female function of the polliniferous morph was only 16 % that of the female morph in the MAL population.

#### RESOURCE SUPPLEMENTATION

In the C43b population, resource supplementation was associated with a significant increase ( $F_{1,36} = 14.2$ ,  $P < 0.001$ ) in mean node number per branch of both sexual phenotypes in season 1 which varied from 6.86 to 9.36 in the polliniferous morph and from 5.36 to 11.03 in females in the control and fertilized treatments respectively. In subsequent seasons the treatment by season interaction was significant ( $F_{3,88} = 3.27$ ,  $P < 0.05$ ) as resource supplementation

became associated with an increase in inflorescence number per node on both sexual phenotypes ( $F_{2, 54} = 16.39$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 5a). For flower number/inflorescence, a significant treatment effect ( $F_{2, 54} = 5.19$ ,  $P < 0.01$ ) was primarily due to a decrease in flower number in the defoliation treatment (Fig 5b). Resource supplementation significantly increased and defoliation decreased ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 9.03$ ,  $P < 0.05$ ) the number of polliniferous plants bearing fruit relative to controls in the second and third seasons (Fig 5c). Resource supplementation was associated with a significant increase in the percentage of inflorescences with at least one fruit on the polliniferous morph in season 3 (Fig. 5d), hence the significant treatment by season interaction ( $df = 5$ ,  $\chi^2 = 49.40$ ,  $P < 0.001$ ) for this trait. A similar interaction effect was observed for fruit set ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 11.37$ ,  $P < 0.01$ ), which also showed a significant effect of treatment ( $df = 2$ ,  $\chi^2 = 18.23$ ,  $P < 0.001$ ). Again, resource supplementation tended to increase fruit set and defoliation to decrease it (Fig. 5e). Over the three years of study, the cumulative percentage of polliniferous plants setting fruit varied from 50% in the defoliation treatment, to 80% of controls and 100% of resource supplemented individuals. In the MAL population, no significant effects of resource supplementation were detected for any of the above traits.

## Discussion

*Antirhea borbonica* has a cryptic sexual polymorphism and shows marked gender variation among populations on La Réunion. In pioneer populations, individuals of polliniferous morph only occasionally produce a small number of fruits, whereas, in late-succession populations the fruit set of polliniferous morph increase. A resource supplementation experiment strongly suggests that this variation has an environmental component.

Theoretical studies of resource allocation to sexual function predict that environmental conditions, size and plant age can cause gender modification (Charnov 1982). In the studies of gender variation in sexually polymorphic species that have been done, a consistent pattern of

gender variation has been revealed with unisexuality favoured in stressful conditions and hermaphrodisism in more benign habitats (Lloyd & Bawa 1984; Costich 1995; Wolfe & Shmida 1997; Barrett *et al.* 1999). The above examples all involve herbaceous species in temperate (often semi-arid) regions. Yet many dioecious species are woody and occur in the tropics. Our demonstration of gender variation among populations of *Antirhea borbonica* on La Réunion thus extends previous work to encompass the world of tropical, woody, unisexual plants.

The long-lived nature of woody species renders gender variation a difficult topic to study. The nature of their life history makes interpretation of patterns of variation, in terms of genetic and environmental determinism, rather difficult. In addition, documenting variation and its temporal nature is compromised by the fact that modifications may occur over a long period. The long-lived nature of woody species nevertheless makes them ideal candidates for the occurrence of gender plasticity, particularly for species that occur in temporally heterogeneous habitats. Our study of populations that differ in age and which contain plants very different in size, combined with a field experimentation in which we manipulated resource levels, provides insightful data for our understanding of gender variation in tropical woody species.

Our results show that the female morph of *Antirhea borbonica* shows strict sexual specialisation with a close to zero male function. In contrast, phenotypic gender of the polliniferous morph is highly variable among-populations. In pioneer populations the polliniferous morph is dominated by non-fruiting plants, whereas in late-succession the polliniferous morph is primarily composed of individuals bearing fruit. These morph-specific patterns are consistent with those reported in other species, where a consistent pattern of greater modification in the polliniferous morph relative to females has been reported (Delph & Lloyd 1991; Wolfe & Shmida 1997; Case & Barrett 2004). Likewise, in gynodioecious

species seed production hermaphrodite is more variable than females (Thompson & Tarayre 2000). The significant increase in vegetative growth and flowering of both sexual phenotypes and a subsequent increased propensity for fruit production in the polliniferous morph following resource supplementation in the early succession population, where resource limitation may occur (Kirman 2003), illustrate that the gender variation we detected is most likely a result of resource limitation in the pioneer populations and this is reinforced with none increasing of fruit production was detected in polliniferous morphs in MAL population. In this population the resource limitation may be lower compared to young populations where there is no soil (Kirman 2003). However, the absence of increased fruit production in individuals of the MAL population may be due to the fact that resource limitation may not be expressed in the short time period of the experiment in this site and / or the greater competition that is likely to occur in this site where *A. borbonica* occurs in dense vegetation. But this suggestion does not conflict with the finding of an effect of resource supplementation in the early succession population which strongly suggests that such gender variation among populations may result from plasticity of individual trees in relation to environmental conditions.

Another indication that gender variation results from sexual plasticity of individuals of the polliniferous morph comes with the finding that when polliniferous trees in pioneer populations were observed over several years they were seen to occasionally produce fruits. In fact, even in the pioneer populations, ~80% of individuals of the polliniferous morph have the capacity to set some fruit in at least one year of the study. As a result, although in any one year the proportion of plants of the polliniferous morph bearing fruit is low in pioneer populations, when repeated observations are made over several years, this proportion increases and becomes nearly equivalent to that in late-succession populations. These results support the idea that the polliniferous morph should be considered as a single sexual

phenotype and illustrate the need for long-term studies and repeated observations in studies of gender variation of woody species. A final point concerning the possibility that female fertility variation in the polliniferous morph is not a result of genetic differentiation among populations concerns the lack of any consistent sex ratio variation among early- and late-succession populations. In our study, the occurrence of increased male-biased gender in polliniferous plants was not associated with a female-biased sex ratio, as theory would predict (Lloyd 1976). All populations except one had sex ratio close to 1:1. The only population within polliniferous morph biased sex ratio is very old population where females's may suffer a cost of reproduction which may reduce their flowering frequency (e.g Pailler *et al.* 1999, *Chassalia* in same habitats on La Réunion) or may reduce their longevity.

Over several years, ~80% of plants of the polliniferous morph have the capacity to set fruit in all populations of *A. borbonica*, and that variation among populations has a strong environmental component. But the sex-ratio values (near to 1:1) strongly suggest that the female contribution of polliniferous morph is negligible in all populations. The maternal fertility advantage of females greatly exceeds that of the polliniferous morph. The three-fold reduction in fruit (seed) per flower, the two-fold reduction in seed germination and the five-fold reduction in seedling survival after germination in the progeny of fruiting plants of the polliniferous morph, reduces its female function to only 16% of that of females, even in late-succession populations. These results obtained in benign conditions for germination and seedling growth, so the female advantage likely to be even stronger in natural populations. Plants of the polliniferous morph thus obtain most of their fitness via their male function, even in late-succession. The reproductive system of this species thus resembles the leaky dioecy of other dioecious species on La Réunion (Humeau *et al.* 1999). Evolution dioecy may be recent and not complete.

Other examples of gender plasticity on individual plants have been detected in monoecious *Sagittaria latifolia* in relation to abiotic conditions (Dorken & Barrett 2003; 2004), subdioecious *Hebe subalpina* (Delph & Lloyd 1991) and hermaphrodites of gynodioecious *Thymus vulgaris* in relation to the flowering phenology of females (Ehlers & Thompson 2004). Our results add to this literature which implicates a significant role of gender plasticity in the regulation of mating opportunities in relation heterogeneous abiotic and biotic environments.

### Acknowledgements

We thank the C.N.R.S., the C.I.R.A.D. and the Université de La Réunion and the Région de La Reunion for financial support and Marie Maistre, Annabelle Dos Santos, G. Debussche and Christian Collin for practical help.

### References

- Aronne, G. & Wilcock, C.C. (1994) Reproductive characteristics and breeding system of shrubs of the Mediterranean region. *Functional Ecology*, **8**, 69-76.
- Ashman, T.L. (1994) Reproductive allocation in hermaphrodite and female plants of *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae) using four currencies. *American Journal of Botany*, **81**, 433-438.
- Ashman, T.-L. (1999) Determinants of sex allocation in a gynodioecious wild strawberry: implications for the evolution of dioecy and sexual dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 648-661.
- Baker, H.G. (1955) Self-compatibility and establishment after long-distance dispersal. *Evolution*, **9**, 347-348.

- Barrett, S.C.H. (1992) Gender variation and the evolution of dioecy in *Wurmbea dioica* (Liliaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **5**, 423-444.
- Barrett, S.C.H., Case, A.L. & Peters, G.B. (1999) Gender modification and resource allocation in subdioecious *Wurmbea dioica* (Liliaceae). *Journal of Ecology*, **87**, 123-137.
- Bawa, K.S. (1980) Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, **11**, 15-39.
- Case, A.L. & Barrett, S.C.H. (2001) Ecological differentiation of combined and separate sexes of *Wurmbea dioica* (Colchicaceae) in sympatry. *Ecology*, **82**, 2601-2616.
- Case, A.L. & Barrett, S.C.H. (2004) Environmental stress and the evolution of dioecy: *Wurmbea dioica* (Colchicaceae) in Western Australia. *Evolutionary Ecology*, **18**, 145-164.
- Charlesworth, D. (1999). Theories of the evolution of dioecy. In Gender and sexual dimorphism in flowering plants (eds M.A. Geber, T.E. Dawson & L.F. Delph), pp. 33-60. Springer-Verlag, Berlin.
- Charnov, E.L. (1982) *The theory of sex allocation*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Costich, D.E. (1995) Gender specialization across a climatic gradient: experimental comparison of monoecious and dioecious *Ecballium*. *Ecology*, **76**, 1036-1050.
- Del Moral, R. (1993). Mechanisms of primary succession on volcanoes: A view from Mt. St Helens. *Primary Succession on Land*. (eds J. Miles and D. W. H. Walton) pp. 79-100. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Delph, L.F. (1990a) The evolution of gender dimorphism in New Zealand *Hebe* (Scrophulariaceae) species. *Evolutionary Trends in Plants*, **4**, 85-97.
- Delph, L.F. (1990b) Sex-differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology*, **71**, 1342-1351.



- Delph, L.F. & Lloyd, D.G. (1991) Environmental and genetic control of gender in the dimorphic shrub *Hebe subalpina*. *Evolution*, **45**, 1957-1964.
- Dorken, M.E. & Barrett, S.C.H. (2003) Gender plasticity in *Sagittaria sagittifolia* (Alismataceae), a monoecious aquatic species. *Plant Systematics and Evolution*, **237**, 99-106.
- Dorken, M.E. & Barrett, S.C.H. (2004) Phenotypic plasticity of vegetative and reproductive traits in monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae): a clonal aquatic plant. *Journal of Ecology*, **92**, 32-44.
- Drake, D.R. & Mueller-Dombois, D. (1993) Population development of rain forest trees on a chronosequence of Hawaiian lava flows. *Ecology*, **74**, 1012-1019.
- Eckhart, V.M. (1993) Do hermaphrodites of gynodioecious *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae) trade off seed production to attract pollinators. *Biological Journal of the Linnean Society*, **50**, 47-63.
- Ehlers, B. & Thompson, J.D. (2004) Temporal variation in sex allocation in hermaphrodites of gynodioecious *Thymus vulgaris* L. *Journal of Ecology*, **92**, 15-23.
- Ellner, S.P. & Fussmann, G. (2003) Effects of successional dynamics on metapopulation persistence. *Ecology*, **84**, 882-889.
- Gray, A.J. (1993) The vascular plant pioneers of primary successions: Persistence and phenotypic plasticity. *Primary Succession on Land*. (eds J. Miles & D.W.H. Walton) pp. 179-191. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Herrera, C.M. (1982) Breeding systems and dispersal-related maternal reproductive effort of southern Spanish bird-dispersed plants. *Evolution*, **36**, 1299-1314.
- Humeau, L., Pailler, T. & Thompson, J.D. (1999) Cryptic dioecy and leaky dioecy in endemic species of *Dombeya* (Sterculiaceae) on La Réunion. *American Journal of Botany*, **86**, 1437-1447.

- Humeau, L. Pailler, T. & Thompson, J.D. (2000) Gender variation and flower size dimorphism in the dioecious tree *Dombeya ciliata* endemic to la Réunion Island. *Biotropica*, **32**, 463-472.
- Kirman S. (2003) *Cycles biogéochimiques et biodiversité en forêt tropicale humide : étude d'une succession primaire sur les coulées basaltiques (La Réunion Océan indien)*. PhD Thesis. Université de Marseille CEREGE Aix en Provence.
- Lloyd, D.G. (1976) The transmission of *genes via pollen and ovules in gynodioecious angiosperms*. *Theoretical Population Biology*, **9**, 299-316.
- Lloyd, D.G. & Bawa, K.S. (1984) Modification of the gender of seed plants in varying conditions. *Evolutionary Biology*, **17**, 255-338.
- Miles, J. & Walton, D.W.H. (1993). Primary succession revisited. In Primary Succession on Land (eds J. Miles & D.W.H. Walton), Vol. 12, pp. 295-302. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Olson, M.S. (2001) Patterns of fruit production in the subdioecious plant *Astilbe biternata* (Saxifragaceae). *Journal of Ecology*, **89**, 600-607.
- Renner, S.S. & Ricklefs, R.E. (1995) Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany*, **82**, 596-606.
- Ross, M.D. (1982) Five evolutionary pathways to subdioecy. *American Naturalist*, **119**, 297-318.
- Sakai, A.K., Wagner, W.L., Ferguson, D.M., & Herbst, D.R. (1995) Origins of dioecy in the Hawaiian flora. *Ecology*, **76**, 2517-2529.
- SAS Institute Inc. (2001). SAS/STAT Software Release 8.2. Cary, NC, SAS Institute Inc.
- Strasberg, D. (1994) *Dynamique des forêts tropicales de l'île de La Réunion, processus d'invasion et de régénération sur les coulées volcaniques*. PhD thesis, Université de Montpellier, Montpellier.

- Strasberg, D. (1995) Processus d'invasion par les plantes introduites à La Réunion et dynamique de la végétation sur les coulées volcaniques. *Ecologie*, **26**, 169-180.
- Thébaud C & Strasberg D (1997) Plant dispersal in fragmented landscapes: a field study of woody colonization in rainforest remnants of the Mascarene archipelago. *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. (eds W.F. Laurence & R.O. Bierregaard) pp 321-332. Chicago University Press, Chicago.
- Thompson, J.D., McNeilly, T. & Gray, A.J. (1993) The demography of clonal plants in relation to successional habitat change: the case of *Spartina anglica*. *Primary Succession on Land*. (eds J. Miles & D.W.H. Walton) pp 193-207. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Thompson, J.D. & Tarayre, M. (2000) Exploring the genetic basis and proximate causes of variation in female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution*, **54**, 1510-1520.
- Verdcourt, B., Leroy, J.F. & Tirvengadam, D.D. (1989) Rubiacées. *Flore des Mascareignes La Réunion, Maurice, Rodrigues* (eds J. Bosser, T. Cadet, J. Guého & W. Marais). pp 122-124 Vol 107-108 bis, The sugar industry research institute, Mauritius L'office de la recherche scientifique et technique outre mer, Paris, The royal botanic garden, Kew.
- Wolfe, L.M. & Shmida, A. (1997) The ecology of sex expression in a gynodioecious Israeli desert shrub (*Ochradenus baccatus*). *Ecology*, **78**, 101-110.
- Wood, D.M. & Del Moral, R. (1987) Mechanisms of early primary succession in subalpine habitats on Mount St Helens. *Ecology*, **68**, 780-790.

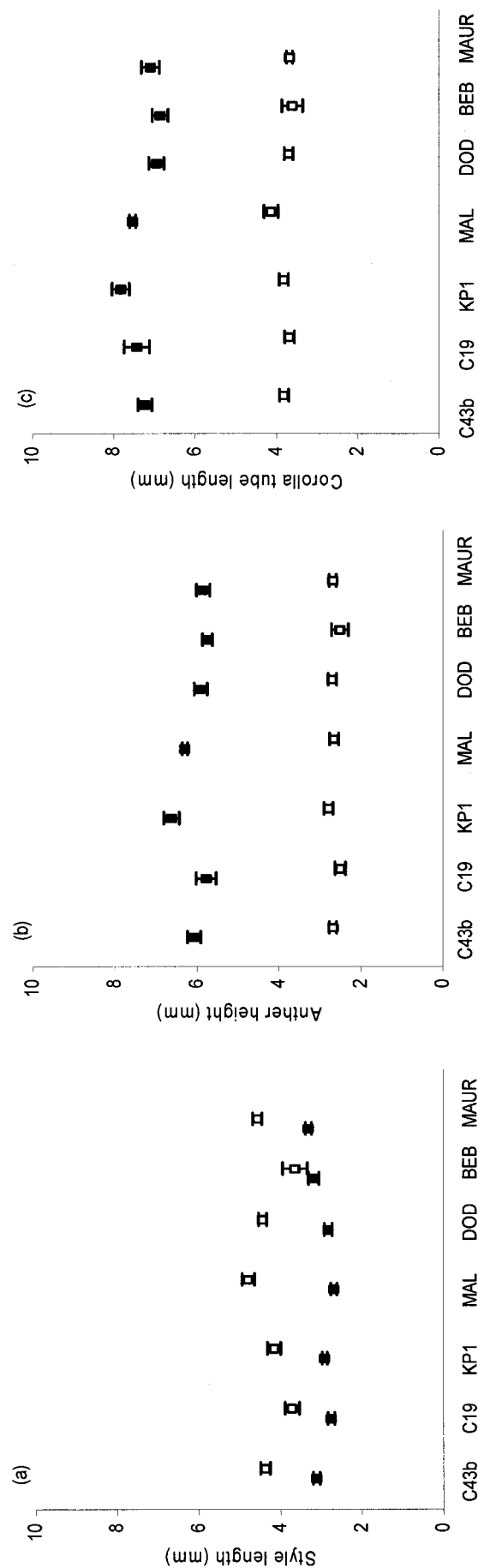
**Table 1** Characteristics of the studied populations

| Site | Code | Lava flow age | Successional status and community type                                                                |
|------|------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | C61  | 1961          | Early-succession: very young population with few reproductive individuals                             |
| 2    | C43a | 1943          | Early-succession: young population with many reproductive individuals                                 |
| 3    | C43b | 1943          | Early-succession: young population with many reproductive individuals                                 |
| 4    | C43c | 1943          | Early-succession: young population with many reproductive individuals                                 |
| 5    | C31  | 1931          | Early-succession: young population with many reproductive individuals                                 |
| 6    | C19  | 1900          | Early-succession: young population with many reproductive individuals                                 |
| 7    | KP1  | 200-300 years | Mid-succession: forest fragment untouched by recent lava flows                                        |
| 8    | KP2  | 200-300 years | Mid-succession: forest fragment untouched by recent lava flows                                        |
| 9    | MAL  | > 500 years   | Late-succession: climax forest in the Mare Longue nature reserve at ~300m elevation:                  |
| 10   | DOD  | > 500 years   | Late-succession (Piton des Neiges volcano): semi-dry climax tropical forest at ~1000m near Dos D'âne  |
| 11   | CIL  | > 500 years   | Late-succession (Piton des Neiges volcano): Climax mid-altitude tropical forest at ~1000m near Cilaos |
| 12   | BEB  | > 500 years   | Late-succession (Piton des Neiges volcano). Climax tropical cloud forest (Bébour) at 1400m elevation  |
| 13   | MAU  | > 500 years   | Pétrin natural reserve on Mauritius                                                                   |

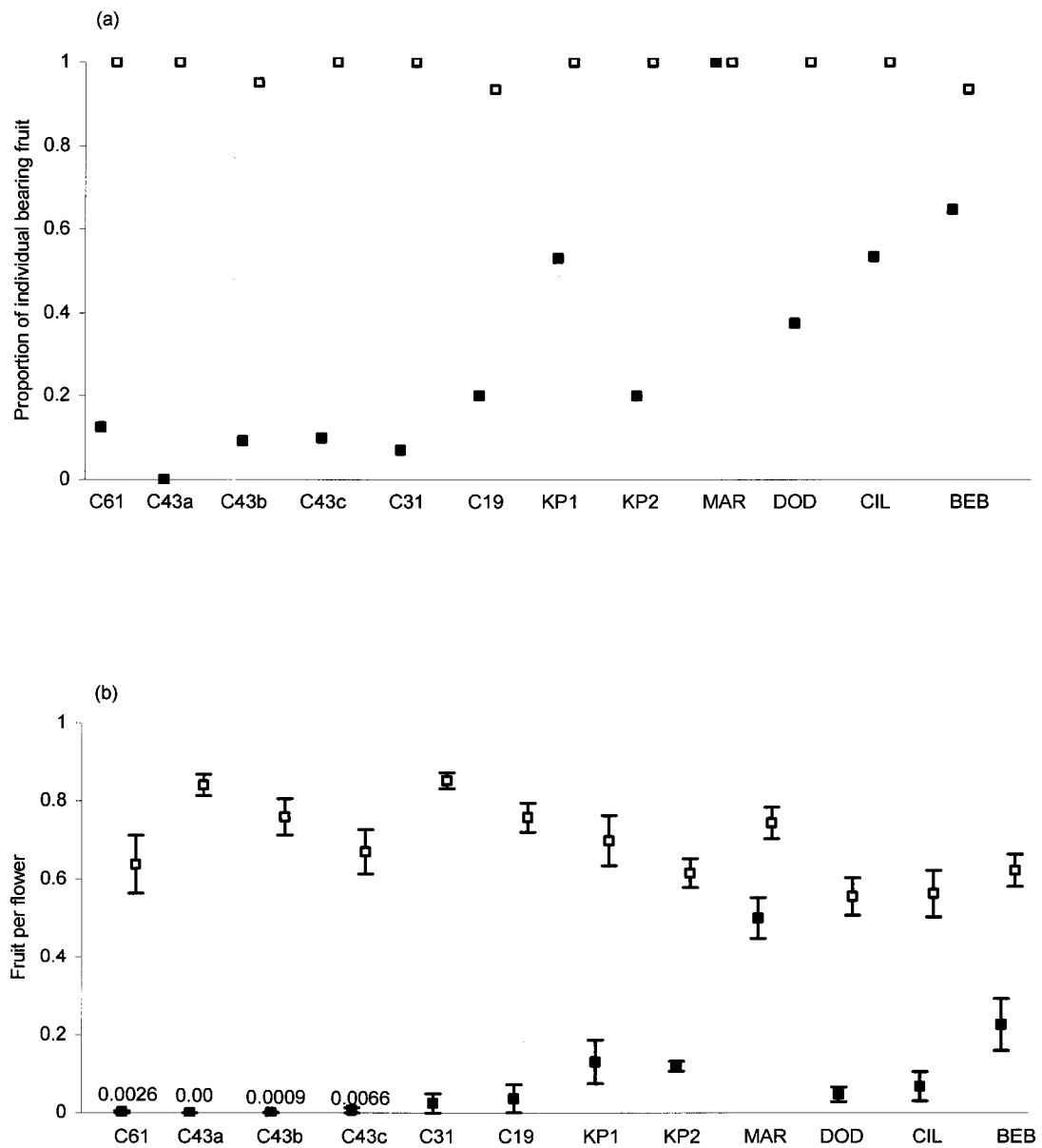
**Table 2:** Sample size of sexed individuals and polliniferous morph frequency within 12 populations of *Antirhea borbonica* on La Réunion.

| Populations | 2003        |                                   |     |                | 2004        |                                   |     |                |
|-------------|-------------|-----------------------------------|-----|----------------|-------------|-----------------------------------|-----|----------------|
|             | Sample size | Proportion of polliniferous morph | ddl | G <sup>2</sup> | Sample size | Proportion of polliniferous morph | ddl | G <sup>2</sup> |
| <b>C61</b>  | -           | -                                 | -   | -              | 16          | 56.3                              | 1   | 0.25           |
| <b>C43a</b> | 78          | 46.2                              | 1   | 0.46           | 80          | 47.5                              | 1   | 0.20           |
| <b>C43b</b> | 67          | 49.3                              | 1   | 0.01           | 81          | 51.9                              | 1   | 0.11           |
| <b>C43c</b> | 82          | 54.2                              | 1   | 0.2            | 74          | 54.1                              | 1   | 0.49           |
| <b>C31</b>  | -           | -                                 | -   | -              | 61          | 54.1                              | 1   | 0.41           |
| <b>C19</b>  | 108         | 56.5                              | 1   | 1.82           | 96          | 57.3                              | 1   | 2.05           |
| <b>KP1</b>  | 85          | 61.2                              | 1   | 4.28*          | 81          | 56.8                              | 1   | 1.50           |
| <b>KP2</b>  | -           | -                                 | -   | -              | 78          | 52.6                              | 1   | 0.21           |
| <b>MAL</b>  | 100         | 51                                | 1   | 0.04           | 95          | 50.5                              | 1   | 0.01           |
| <b>CIL</b>  | 76          | 57.9                              | 1   | 1.90           | 71          | 49.3                              | 1   | 0.01           |
| <b>DOD</b>  | 73          | 54.8                              | 1   | 0.67           | 75          | 54.7                              | 1   | 0.65           |
| <b>BEB</b>  | 91          | 61.5                              | 1   | 4.89*          | 87          | 62.1                              | 1   | 5.12*          |

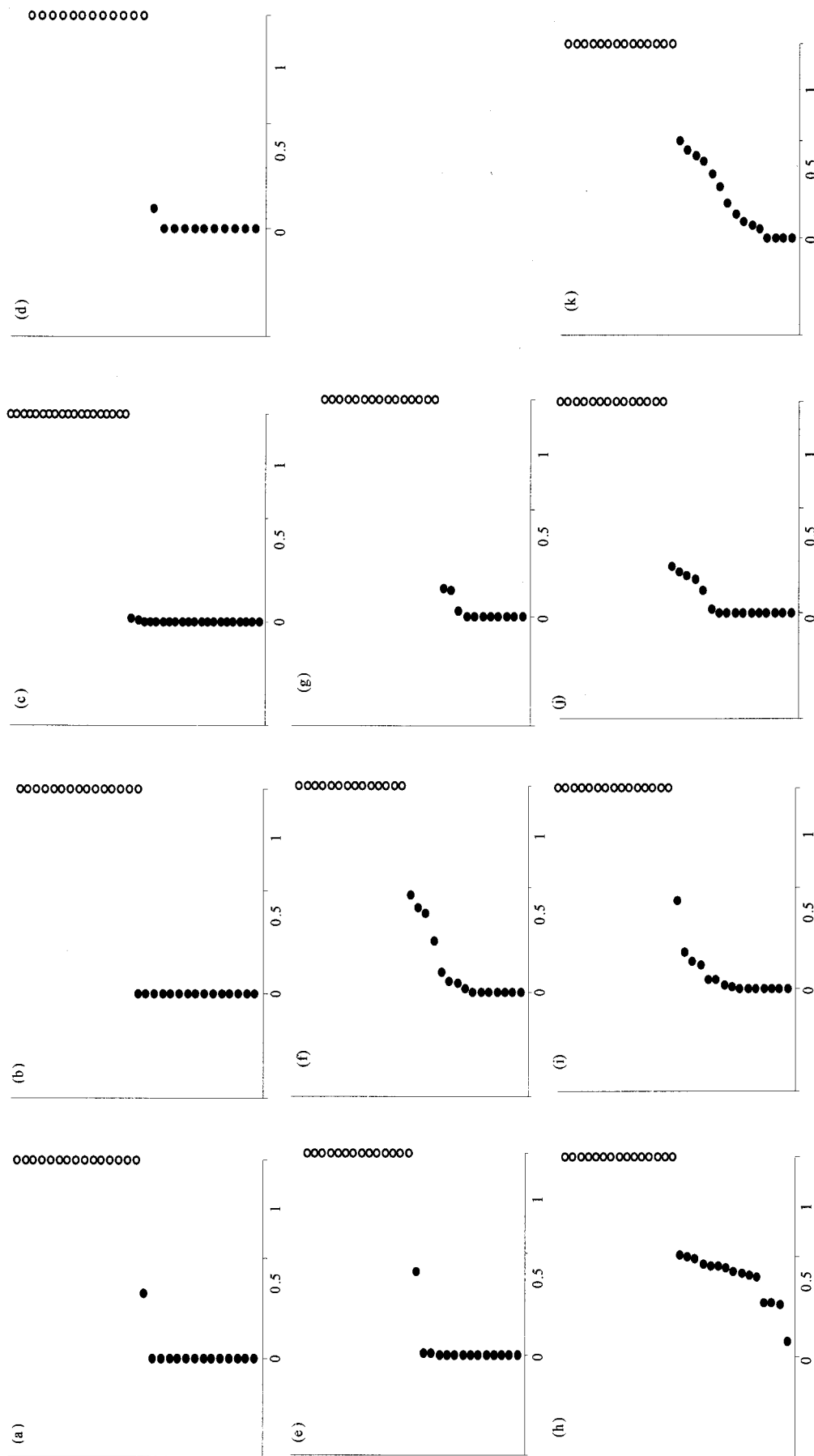
\* P < 0.05



**Fig. 1** Flower size variation in the polliniferous morph (closed squares) and females (open squares) in six populations of *Antirhea borbonica* on La Réunion and one population on Mauritius: (a) style length, (b) anther height, (c) corolla length.

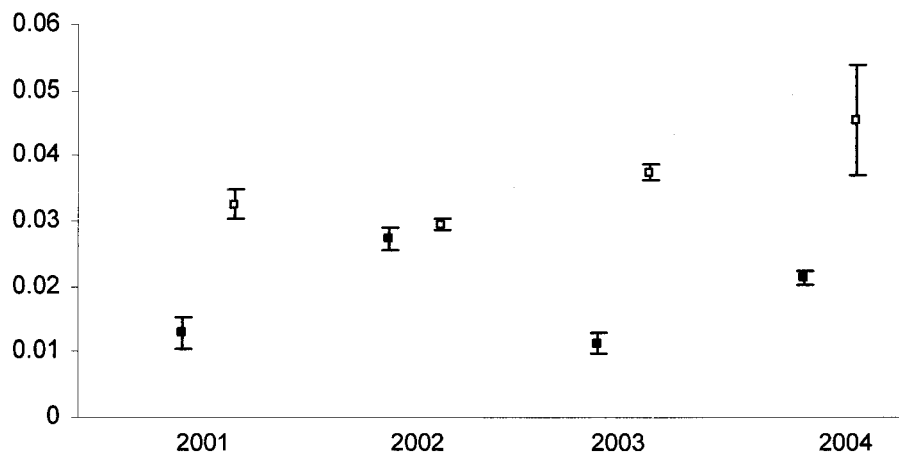


**Fig. 2** Maternal fertility of the polliniferous morph (closed squares) and females (open squares) of *Antirhea borbonica* in twelve populations on La Réunion in 2004: (a) proportion of individuals bearing fruit, (b) the proportion of flowers with fruit. The value of some points is noted on the figure because of extremely low values.

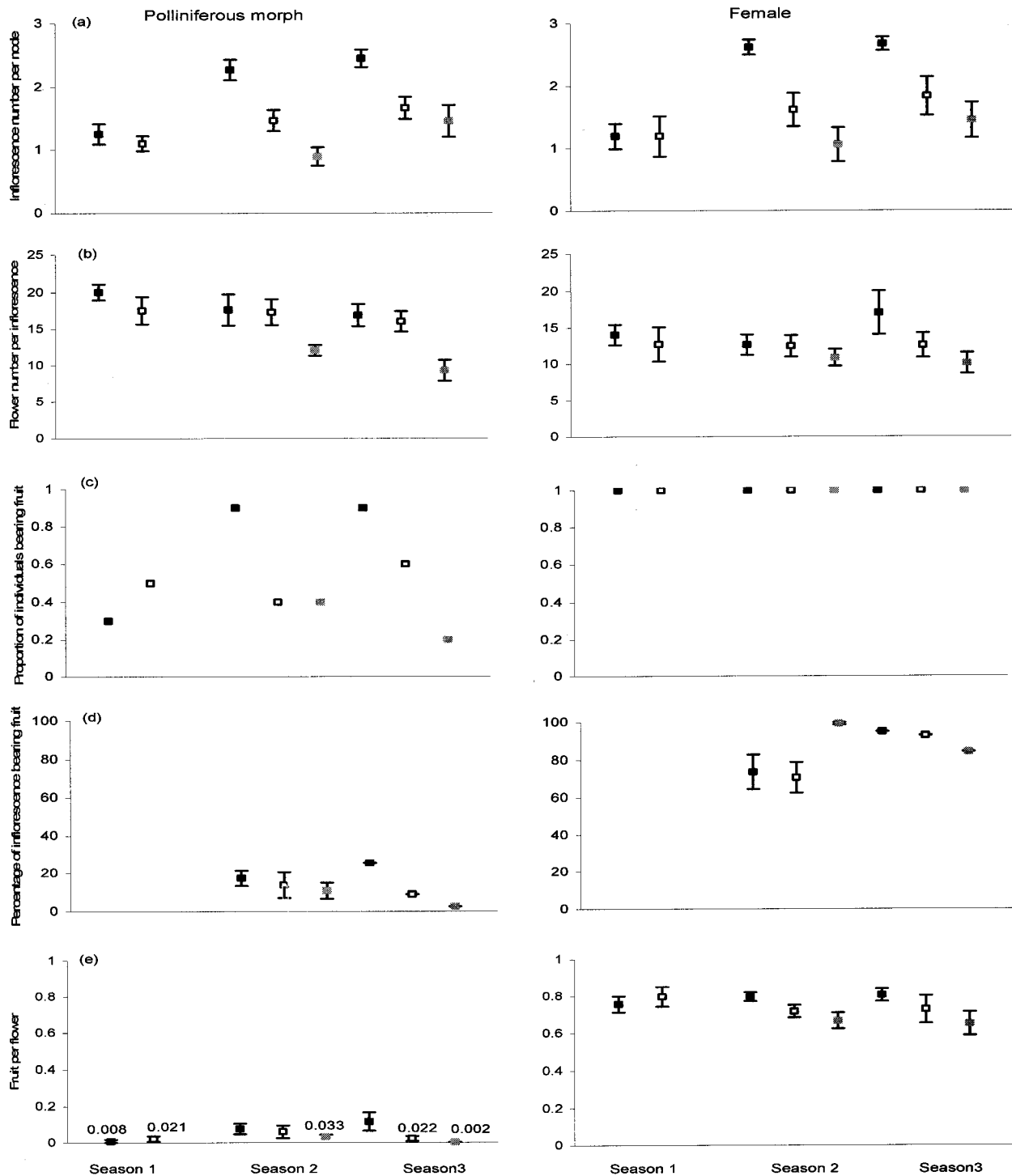


**Fig.3** Phenotypic gender G of the polliniferous morph (closed circles) and females (open circles) of *Antirhea borbonica* in (a) C31, (b) C43a, (c) C43b, (d) C43c, (e) C19, (f) KP1, (g) KP2, (h) MAL, (i) CIL, (j) DOD, (k) BEB populations.





**Fig. 4** Seed weight variation in the polliniferous morph (closed squares) and females (open squares) of *Antirhea borbonica* in MAL population on La Réunion in 2001, 2002, 2003 and 2004.



**Fig. 5** Reproductive trait and fertility variation in the resource supplementation experiment in the C43b pioneer population of *Antirhea borbonica*: (a) inflorescence number, (b) flower number per inflorescence, (c) proportion of individuals bearing fruit (d) proportion of inflorescences bearing fruit, (e) proportion of flowers bearing fruit per inflorescence. Treatments are: control (open squares), fertilized (closed squares) and defoliated (grey squares).

# ANNEXE 3

## CAS 1 : Résultats du modèle avec $k_1 = 1.5$ et $k_2 = 1$

| A) <u>CAS 1</u> Population dioïque sans autofécondation |     |   |   |   |                    |                           |         |       |
|---------------------------------------------------------|-----|---|---|---|--------------------|---------------------------|---------|-------|
| R                                                       | a   | b | t | d | Syst. Reproduction | Fréquence des individus % |         |       |
|                                                         |     |   |   |   |                    | Hermaphrodite             | Femelle | Mâle  |
| 0.5                                                     | 0   | 0 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1                                                       | 0   | 0 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1.50                                                    | 0   | 0 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 2                                                       | 0   | 0 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 3                                                       | 0   | 0 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 4                                                       | 0   | 0 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 10                                                      | 0   | 0 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 0.5                                                     | 0.5 | 1 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1                                                       | 0.5 | 1 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1.50                                                    | 0.5 | 1 | 1 | 0 | ANDRODIOIQUE       | 75                        | 0       | 25    |
| 2                                                       | 0.5 | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 3                                                       | 0.5 | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 4                                                       | 0.5 | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 0.5                                                     | 1   | 1 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1                                                       | 1   | 1 | 1 | 0 | ANDRODIOIQUE       | 79.38                     | 0       | 20.62 |
| 1.50                                                    | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 2                                                       | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 3                                                       | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 4                                                       | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 0.1                                                     | 2   | 2 | 1 | 0 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 0.5                                                     | 2   | 2 | 1 | 0 | ANDRODIOIQUE       | 58.86                     | 0       | 46.14 |
| 1                                                       | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 1.50                                                    | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 2                                                       | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 3                                                       | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 4                                                       | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |

| B) <u>CAS 1</u> Population dioïque 50% d'autofécondation et $d = 0.7$ |     |   |     |     |                    |                           |         |      |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|---|-----|-----|--------------------|---------------------------|---------|------|
| R                                                                     | a   | b | t   | d   | Syst. Reproduction | Fréquence des individus % |         |      |
|                                                                       |     |   |     |     |                    | Hermaphrodite             | Femelle | Mâle |
| 0.5                                                                   | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                     | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1.50                                                                  | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 2                                                                     | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 3                                                                     | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 4                                                                     | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 10                                                                    | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 0.5                                                                   | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                     | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1.50                                                                  | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 2                                                                     | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | ANDRODIOIQUE       | 63                        | 0       | 7    |
| 3                                                                     | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                                     | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.5                                                                   | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                     | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1.3                                                                   | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | ANDRODIOIQUE       | 95.3                      | 0       | 4.7  |
| 1.50                                                                  | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                                     | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                                     | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                                     | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.5                                                                   | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                     | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | ANDRODIOIQUE       | 95                        | 0       | 5    |
| 1.50                                                                  | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                                     | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                                     | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                                     | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |

| c) <u>CAS 1</u> Population dioïque 90% d'autofécondation et $d = 0.7$ |     |   |     |     |                    |                           |         |       |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|---|-----|-----|--------------------|---------------------------|---------|-------|
| R                                                                     | a   | b | t   | d   | Syst. Reproduction | Fréquence des individus % |         |       |
|                                                                       |     |   |     |     |                    | Hermaphrodite             | Femelle | Mâle  |
| 0.5                                                                   | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1                                                                     | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1.50                                                                  | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 2                                                                     | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 3                                                                     | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 4                                                                     | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 10                                                                    | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 0.5                                                                   | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1                                                                     | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1.50                                                                  | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 2                                                                     | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | ANDRODIOIQUE       | 89.15                     | 0       | 10.85 |
| 3                                                                     | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 4                                                                     | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 0.5                                                                   | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1                                                                     | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1.3                                                                   | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | ANDRODIOIQUE       | 92                        | 0       | 8     |
| 1.50                                                                  | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 2                                                                     | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 3                                                                     | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 4                                                                     | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 0.5                                                                   | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50    |
| 1                                                                     | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | ANDRODIOIQUE       | 96                        | 0       | 4     |
| 1.50                                                                  | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 2                                                                     | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 3                                                                     | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |
| 4                                                                     | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0     |

CAS 2 : Résultats du modèle avec  $k_1 = 0.8$  et  $k_2 = 1.5$

| A) CAS 2 Population gynodioïque sans autofécondation |     |   |   |   |                    |                           |         |      |
|------------------------------------------------------|-----|---|---|---|--------------------|---------------------------|---------|------|
| R                                                    | a   | b | t | d | Syst. Reproduction | Fréquence des individus % |         |      |
|                                                      |     |   |   |   |                    | Hermaphrodite             | Femelle | Mâle |
| 0.1                                                  | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 0.5                                                  | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 1                                                    | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 1.50                                                 | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 2                                                    | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 3                                                    | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 4                                                    | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 10                                                   | 0   | 0 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 0.5                                                  | 0.5 | 1 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 71                        | 29      | 0    |
| 1                                                    | 0.5 | 1 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 90                        | 10      | 0    |
| 1.50                                                 | 0.5 | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                    | 0.5 | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                    | 0.5 | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                    | 0.5 | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.5                                                  | 1   | 1 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 97                        | 3       | 0    |
| 1                                                    | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 1.50                                                 | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                    | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                    | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                    | 1   | 1 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.1                                                  | 2   | 2 | 1 | 0 | GYNODIOIQUE        | 57.6                      | 42.4    | 0    |
| 0.5                                                  | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 1                                                    | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 1.50                                                 | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                    | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                    | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                    | 2   | 2 | 1 | 0 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |

| B) <u>CAS 2</u> Population gynodioïque 50% d'autofécondation et $d = 0.7$ |     |   |     |     |                    |                           |         |      |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|---|-----|-----|--------------------|---------------------------|---------|------|
| R                                                                         | a   | b | t   | d   | Syst. Reproduction | Fréquence des individus % |         |      |
|                                                                           |     |   |     |     |                    | Hermaphrodite             | Femelle | Mâle |
| 0.1                                                                       | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 0.5                                                                       | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 1                                                                         | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 1.50                                                                      | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 2                                                                         | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 3                                                                         | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 4                                                                         | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 10                                                                        | 0   | 0 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 0.5                                                                       | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 54.3                      | 45.7    | 0    |
| 1                                                                         | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 59                        | 41      | 0    |
| 1.50                                                                      | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 65                        | 35      | 0    |
| 2                                                                         | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 72.3                      | 27.7    | 0    |
| 3                                                                         | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 90                        | 10      | 0    |
| 4                                                                         | 0.5 | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.5                                                                       | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 61                        | 39      | 0    |
| 1                                                                         | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 78.5                      | 21.5    | 0    |
| 1.50                                                                      | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                                         | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                                         | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                                         | 1   | 1 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.1                                                                       | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 52                        | 48      | 0    |
| 0.5                                                                       | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 1                                                                         | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 1.50                                                                      | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                                         | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                                         | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                                         | 2   | 2 | 0.5 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |

| C) <u>CAS 2</u> Population gynodioïque 90% d'autofécondation et $d = 0.7$ |     |   |     |     |                    |                           |         |      |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|---|-----|-----|--------------------|---------------------------|---------|------|
| R                                                                         | a   | b | t   | d   | Syst. Reproduction | Fréquence des individus % |         |      |
|                                                                           |     |   |     |     |                    | Hermaphrodite             | Femelle | Mâle |
| 0.5                                                                       | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                         | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1.50                                                                      | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 2                                                                         | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 3                                                                         | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 4                                                                         | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 10                                                                        | 0   | 0 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 0.5                                                                       | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                         | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1.50                                                                      | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 2                                                                         | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 56                        | 44      | 0    |
| 3                                                                         | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 63                        | 37      | 0    |
| 4                                                                         | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 76                        | 24      | 0    |
| 10                                                                        | 0.5 | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.5                                                                       | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                         | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 59                        | 41      | 0    |
| 1.50                                                                      | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | GYNODIOIQUE        | 68.8                      | 31.2    | 0    |
| 2                                                                         | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                                         | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                                         | 1   | 1 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 0.5                                                                       | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | DIOIQUE            | 0                         | 50      | 50   |
| 1                                                                         | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 1.50                                                                      | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 2                                                                         | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 3                                                                         | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |
| 4                                                                         | 2   | 2 | 0.1 | 0.7 | HERMAPHRODISME     | 100                       | 0       | 0    |



Isolation of ten polymorphic microsatellite loci from *Antirhea borbonica* (Rubiaceae)

I. Litrico, J. Gilles, P. Sourrouille and H. Vignes

Molecular Ecology Notes (2004) in press

## PRIMER NOTE

**Isolation of 10 polymorphic microsatellite loci from *Antirhea borbonica* (Rubiaceae)**

I. LITRICO, J. GILLES, P. SOURROUILLE and H. VIGNES

Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France

**Abstract**

We report here the characteristics of 10 microsatellite markers isolated from a microsatellite-enriched DNA library from *Antirhea borbonica*, Gmel (Rubiaceae). *Antirhea borbonica* is an endemic tree on the islands of La Réunion and Mauritius (Indian Ocean) where it occurs on young lava flows (fragmented and perturbed habitat) and in old primary forest. Ten polymorphic loci were characterized, with two to 15 alleles per locus, based on samples from six populations. These loci will be useful for analysing population structure in a metapopulation context where populations frequently go extinct.

**Keywords:** *Antirhea borbonica* (Rubiaceae), fragmented habitat, microsatellites

Received 22 April 2004; revision accepted 16 June 2004

*Antirhea borbonica* (Rubiaceae) is endemic to the islands of La Réunion and Mauritius in the Indian Ocean. This species is an abundant pioneer shrub on early lava flows and persists through different successional stages and climax rain forest (Strasberg 1995). It often occurs in disturbed or fragmented habitats; indeed on La Réunion *A. borbonica* is abundant on the slopes of the 'Piton de la Fournaise' volcano. Populations experience recurrent colonization and extinction which might be indicative of metapopulation functioning. This species thus constitutes an interesting model for the study of colonization dynamics in fragmented habitats. Moreover, the reproductive system is variable among populations of this species along a successional gradient (Litrico 2001). However, genetic markers are not available for this species, which prevents further work on these issues. Consequently, we have developed microsatellite markers to analyse the genetic diversity and population structure in relation to reproductive system in the fragmented habitats where this species occurs.

Plant DNA was extracted from leaves using the QIAmp plant kit (QIAGEN, IMP). The isolation of microsatellite loci from an enriched (GAA<sub>n</sub> and TAA<sub>n</sub>) library was performed following Dutech *et al.* (2000), using biotin-labelled microsatellite oligoprobes and streptavidin-coated magnetic beads, with the following modifications: (i) there was no size selection after digestion with the restriction enzyme; (ii) XL10 Gold ultracompetent cells (Stratagene) were used;

(iii) recombinant clones were screened with GAA<sub>8</sub> and TAA<sub>8</sub> and AGE1 (AAACAGCTATGACCATGATTAC) or AGE2 (TTGTAAAACGACGGCCAGTG) oligonucleotides using a modified polymerase chain reaction (PCR) method (Waldbieser 1995); (iv) the PCR reagents were 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% (v/v) Tween 20, 1 µM of each primer, 1.875 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP and 0.75 U of *Taq* DNA polymerase (Red Gold Star; Eurogentec) and (v) the PCR program was 2 min of denaturation at 94 °C, 27 cycles at 94 °C for 30 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 2 min and 5 min of elongation at 72 °C. One hundred and twenty-two clones were screened, 61 of which gave a positive signal. Thirty-five positive clones were sequenced using an ABI PRISM® 310 genetic analyser (Applied Biosystem). It was possible to define the PCR primer in 16 sequences. Amplification reactions were carried out separately for each locus in 20 µL including 0.1 µL of each 10 µM fluorescent-labelled primer and unlabelled primer (Table 1), 2 µL of 10× manufactured reaction buffer, 2 µL of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µL of 20 mM dNTP mix, 0.08 µL of 5 U/µL *Taq* DNA polymerase (Red Gold Star; Eurogentec) and 1 µL of genomic DNA. The PCRs were performed using a PTC100 thermocycler (MJ Research) in the following conditions: 2 min of denaturation at 94 °C and 35 cycles of 30 s of initial denaturation at 94 °C, 30 s of annealing at a suitable temperature (Table 1), 35 s of extension at 72 °C and 5 min of elongation at 72 °C. Diluted (1:20) PCR products (1 µL) were pooled in 15 µL of deionized formamide and 0.2 µL of GeneScan-500XLROX size standard and analysed on an ABI PRISM® 310 genetic analyser.

Correspondence: Isabelle Litrico. Fax: (+ 33) 467 412138; E-mail: litrico@cefe.cnrs-mop.fr

## 2 PRIMER NOTE

**Table 1** Characteristics of 10 microsatellite loci isolated from *Antirhea borbonica*

| Locus    | Repeated motif                                       | Forward and reverse primer sequences                         | Annealing temp. (°C) | Size range (bp)          | No. of alleles | GenBank Accession no. |
|----------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------|-----------------------|
| AntbT6F  | (GAA) <sub>25</sub>                                  | HEX F: TGCAACAGCTAATGATCTTAACC<br>R: GGCAGCAAAATCTGACGAG     | 59                   | 135–158<br>Discontinuous | 15             | AY583767              |
| AntbT10B | (GAA) <sub>8</sub> G <sub>3</sub> (GAG) <sub>3</sub> | HEX F: GTCTCAACGGACGGGTCTAG<br>R: TTGGACTTCTGGACGATTTG       | 59                   | 235–238                  | 2              | AY583768              |
| AntbT2D  | (GAA) <sub>10</sub>                                  | NED F: TTCCAGAGATAAGGGCTGTG<br>R: ATGGCGTATGGTTTGTGTC        | 59                   | 175–199<br>Discontinuous | 7              | AY583770              |
| AntbT7H  | (TCT) <sub>8</sub>                                   | 6-FAM F: CAGATCGCAGCACCACCTAG<br>R: GATTCATCTCTCGATGACG      | 59                   | 113–125<br>Continuous    | 5              | AY583772              |
| AntbT7C  | (TTC) <sub>7</sub>                                   | 6-FAM F: AAGCTCATTTTGGGTGATTTAC<br>R: TGGCATTTGGAACATAATACTG | 59                   | 212–221<br>Continuous    | 4              | AY583769              |
| AntbT6Ea | (CTT) <sub>8</sub> CC(CT) <sub>4</sub>               | NED F: CCTATCTCTATCTAGGGCTTGC<br>R: GTGAGAGTGTTGCCTCGAC      | 59                   | 133–148<br>Continuous    | 2              | AY583771              |
| AntbP367 | (CTT) <sub>10</sub>                                  | 6-FAM F: GCCTTGGCTTAGAAGAATTAG<br>R: AGAAGAATTATGGTGTGGAAGC  | 58                   | 280–305<br>Discontinuous | 7              | AY583765              |
| AntbP5A9 | (CTT) <sub>8</sub>                                   | 6-FAM F: TCTGAGTTGCCTCTTACTAGCC<br>R: CAGTGAACCCACCTTACTTG   | 58                   | 212–224<br>Discontinuous | 5              | AY583766              |
| AntbP5A4 | (CTT) <sub>10</sub>                                  | HEX F: GTTACATCGCAATCCAAAGC<br>R: ATTTCTGTCTATGGTCTTGCAC     | 58                   | 131–146<br>Discontinuous | 4              | AY583774              |
| AntbT6A  | (AAG) <sub>10</sub>                                  | NED F: GTAAGTGGAGCCGACTG<br>R: CTCAACGCCTGTTAGCTCTC          | 59                   | 224–239<br>Discontinuous | 4              | AY583773              |

**Table 2** Mean number of alleles per locus ( $N_{all}$ ), observed heterozygosity ( $H_O$ ), Nei's diversity ( $H_E$ ) and  $F_{IS}$  (Weir & Cockerham 1984)

| Site        | $N_{all}$ | $H_O$ | $H_E$ | $F_{IS}$ |
|-------------|-----------|-------|-------|----------|
| C1976       | 3.3       | 0.27  | 0.41  | 0.35     |
| C1961       | 3.2       | 0.30  | 0.39  | 0.24     |
| Kipuka      | 3         | 0.22  | 0.37  | 0.40     |
| Mare Longue | 3.1       | 0.21  | 0.40  | 0.48     |
| Cilaos      | 2.8       | 0.27  | 0.37  | 0.27     |
| Petrin      | 3.3       | 0.22  | 0.37  | 0.39     |

The variability was screened at 16 loci in six populations (Table 2) with 15 individuals per population. Five populations of *A. borbonica* were sampled on La Réunion: three populations on the lowland slopes of the volcano where lava flows occur (C1976, C1961 and Kipuka) and two in old successional stages outside the main area of lava flows (Mare Longue and Cilaos). A population from Mauritius (Petrin) was also analysed. Ten of the 16 loci were found to be polymorphic (Table 1). A mean of 5.5 alleles was detected per locus over populations with a mean per locus and population of 3.11. Linkage disequilibrium was tested in 123 cases using 1000 permutations implemented by GENETIX version 4.04 (Belkhir *et al.* 2001). Only three tests were significant at 5%, a level less than that expected by chance. Nei's gene diversity values ranged from 0.37 to 0.41 and the observed heterozygosity ranged between 0.21 and 0.30 (Table 2). In all cases we observed a heterozygosity

deficit which was variable among loci. The large  $F_{IS}$  value at locus T6F (0.73) may result from null alleles which may thus contribute to the deficit of heterozygotes. The  $F_{ST}$  estimates are in accordance with those of Weir & Cockerham (1984) (locus T6F removed), ranging between 0.007 and 0.386. All population pairs were significantly different except for comparisons between Kipuka and C1961 and C1976 and C1961 (1000 permutations conducted using GENETIX version 4.04).

The loci characterized will thus be particularly useful for the analysis of diversity and population structure in this species. A study based on these markers is now under way to analyse the process of colonization of *A. borbonica* in relation to reproductive trait variations in perturbed and fragmented habitats. Moreover, these microsatellite markers may be useful for other species in the genus *Antirhea* which occur in central and South America (Jansen *et al.* 1984; Castillo-Campos & Lorence 1985).

### Acknowledgements

The authors acknowledge T. Pailler for his encouragement, J. D. Thompson, Joëlle Ronford and Philippe Jarne for correcting and constructively criticizing the manuscript and Chantal Debain. This work was supported by funds from Conseil Régional de l'île de La Réunion.

### References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2001) GENETIX 4.02, logiciel sous Windows™ pour la génétique des

- populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Castillo-Campos G, Lorence DH (1985) *Antirhea aromatica* (Rubiaceae, Guettardeae), a new species from Veracruz, Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **72**, 268–271.
- Dutech C, Ansellem L, Billote N, Jarne P (2000) Characterization of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci using an enrichment protocol in the neotropical tree species *Vouacapoua americana*. *Molecular Ecology*, **9**, 1433–1435.
- Jansen ME (1984) A synopsis of *Guettardella* benth. and old world species of *Antirhea* A.L. de Jussieu (Rubiaceae: Guettardeae). *Blumea*, **29**, 565–588.
- Strasberg D (1995) Processus d'invasion par les plantes introduites à La Réunion et dynamique de la végétation sur les coulées volcaniques. *Ecologie*, **26**, 169–180.
- Waldbieser GC (1995) PCR-based identification of AT-rich tri and tetranucleotide repeat loci in an enriched plasmid library. *BioTechniques*, **19**, 742–744.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.

Spatial structure of genetic variation and primary succession in the pioneer woody  
species *Antirhea borbonica* on La Réunion

I. LITRICO<sup>1,2</sup>, J. RONFORT<sup>3</sup>, R. VERLAQUE<sup>4</sup> AND J.D. THOMPSON<sup>1</sup>

Manuscrit soumis à Molecular Ecology

Spatial structure of genetic variation and primary succession in the pioneer woody species

*Antirhea borbonica* on La Réunion

I. LITRICO<sup>1,2</sup>, J. RONFORT<sup>3</sup>, R. VERLAQUE<sup>4</sup> AND J.D. THOMPSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR 5175 Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, 1919 Route de Mende,  
34293 Montpellier cedex 5, France

<sup>2</sup> UMR C53, Peuplement végétaux et bioagresseurs en milieu tropical, Université de La  
Réunion, 7 Chemin de L'Irat, 97417 Saint Pierre, La Réunion

<sup>3</sup> UMR 1097, Diversité et génome des plantes cultivées, INRA- SGAP, Chemin de Mezouls  
34130 Mauguio, France

<sup>4</sup> UMR 6116, Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie CNRS – Université de  
Provence, Centre St-Charles, Laboratoire de Biosystématique et Ecologie méditerranéenne, 3  
place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 3, France

**KEYWORDS:** Dioecy, kin-structured colonization, island, metapopulation, primary succession

**CORRESPONDING AUTHOR:** Isabelle Litrico, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive,  
CNRS, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier cedex 5, France Fax: 00 33 4 67 41 21 38  
E-mail: isabelle.litrico@cefe.cnrs-mop.fr

**Abstract**

In this study we quantify the spatial genetic structure of a pioneer woody species *Antirhea borbonica* in a chrono-sequence of primary succession on the lava flows of the Piton de La Fournaise volcano on the island of La Réunion. Using microsatellite loci and AFLP markers we compare genetic variability within- and among-populations in early- and late-succession populations in a landscape where extinction and re-colonization are recurrent (within the Caldera) and in late-succession populations outside of the caldera in a more stable landscape. This study has two key results. First, we detected no evidence that founder events increase genetic differentiation among colonizing populations, since  $F_{st}$  values among early- and among late-succession populations were similar. Second,  $F_{is}$  values are consistently high in all populations, despite the fact that *A. borbonica* populations are functionally close to dioecy and thus expected to have an outcrossing mating system. We discuss how ecological processes acting during colonization and primary succession, namely dispersal limitation on colonization, facilitation by conspecific individuals and other pioneer species and nucleation under female colonists, may create the conditions for marked spatial aggregation and kin-structured colonization in pioneer populations. The maintenance of high  $F_{is}$  values in all populations suggests that such spatial structure has a lasting effect during succession. These results provide a novel illustration of the spatial pattern of genetic variation in a metapopulation whose age-structure is associated with an ecological gradient of primary succession.

## Introduction

The ecological processes of migration and colonization are crucial to species survival and can have a profound impact on the evolution of spatial genetic structure within and among natural populations (Husband & Barrett 1996). There is thus a long tradition of work on the genetic consequences of different colonization dynamics (Slatkin 1977, 1993, Wade & McCauley 1988, Whitlock & McCauley 1990, Austerlitz *et al.* 1997, Le Corre & Kremer 1998). Indeed, data on the spatial genetic structure of populations provide key information for reconstructing the history of migration and colonization and for our knowledge of the persistence and evolutionary potential of a species in a new environment (e.g. Hewitt 1996, Petit *et al.* 1997).

Common to all organisms, episodes of colonization can be critical for the evolution of genetic differentiation among plant populations. Two particular situations illustrate this theme. First, where seeds colonise isolated sites in a new continental region or on an island as a result of long-distance dispersal, the colonising population is immediately isolated from source populations. Genetic divergence can thus occur as a result of local founder events and/or the action of natural selection on the colonist populations (Barrett 1996). Second, if colonization and extinction occur repeatedly, i.e. in species of open, disturbed or early succession habitats, the distribution of gene frequencies among patches of suitable habitat may reflect the age structure of different populations (McCauley 1991).

Colonization events frequently involve the establishment of a small population; hence, only a small sample of the genetic variability in the source population may be represented in the colonist population. This founder event can have dramatic consequences for the spatial structure of genetic differentiation. For example, newly colonised sites may show higher differentiation among themselves than that observed among older populations as a result of founder events during colonization (Whitlock & McCauley 1990; McCauley *et al.* 1995; Giles & Goudet 1997). The amounts of variability within colonist populations and levels of



differentiation among them, relative to that among source populations, will however depend on the mode of group formation. In the propagule pool model (colonist population formed from a single source), extinction and re-colonization increase differentiation among colonist populations, whereas in the migrant pool model (several source populations potentially contribute to the colonization event) this may not be the case (Slatkin 1977, Wade & McCauley 1988; McCauley 1991). The spatial structure of genetic variation will thus depend on the combined effects of the relative rates of dispersal and arrival at a site, the number and source of colonists, and the number of habitat patches (McCauley 1991).

Situations where extinction and re-colonization are recurrent reflect what is now recognised as a metapopulation system of sub-populations which are inter-connected during episodes of colonization. A particularly appealing example of such structure concerns gradients of primary succession in which some individual species colonise early-successional stages and persist into late-succession. Although such situations provide a potential illustration of age structure similar to that proposed for metapopulation dynamics, the history of extinction and colonization episodes is often only poorly known. Hence, there have been relatively few studies of the spatial structure of genetic variation in plant metapopulations that occur in primary succession (Husband & Barrett 1996; McCauley *et al.* 2001).

On the island of La Réunion (Indian Ocean), one of the most active volcanoes on Earth, the Piton de La Fournaise, regularly emits lava flows on the south-east slopes of the island, mostly into the caldera or "Grand Brûlé" (Fig. 1). This volcanic activity causes habitat fragmentation and creates new sites for colonization. In this area, the natural lowland tropical rain forest occurs as fragmented pockets of habitat in a landscape of different-aged lava flows, whose ages (for those that have occurred in the last 300 years) are well-known (Strasberg 1994). On La Réunion, new lava is chemically uniform, but structurally variable (Bachelery 1981 cited by Thébaud & Strasberg 1997), seedling establishment during colonization is

restricted to cracks and crevices which occur at low densities on otherwise barren substrates (Thébaud & Strasberg 1997), percolation is rapid, and available resources are scarce (Del Moral 1993). On new lava there is no seed bank: the sources of colonization of individual lava flows are the fragments of forest that have been spared by lava flows (Thébaud & Strasberg 1997). The recurrent nature of lava flows and the spatial pattern of population development and succession following extinction and colonization in the landscape of the Grand Brûlé have produced a matrix of different-aged vegetation communities which illustrate a chronosequence of primary succession (Cadet 1977; Strasberg 1994).

The purpose of this study is to quantify the spatial structure of genetic variation among and within populations of a pioneer species *Antirhea borbonica* J.F. Gmel (Rubiaceae) which occurs in early- and late-succession populations within the Grand Brûlé and in other more stable communities outside of the region of intense volcanic activity. On La Réunion, *Antirhea borbonica* colonizes young lava flows (some ~25 years old) and maintains populations in late-succession where trees may be >150 years old. Using a combination of microsatellite loci and AFLP markers we contrast patterns of genetic variability within- and among-populations of early-succession in the Grand Brûlé with (1) late-succession populations within the Grand Brûlé (i.e. both groups in a landscape where extinction and colonization are frequent) and (2) late-succession populations outside of the Grand Brûlé where populations are older and occur in a more stable landscape. This represents one of the first attempts to document the spatial pattern of genetic variation in a natural metapopulation whose age-structure is associated with an ecological gradient of primary succession.

## Materials and methods

### *Study site and selected populations*

The study region (Fig. 1) is located on the islands of La Réunion and Mauritius in the Indian Ocean. *Antirhea borbonica* is a woody endemic species from both islands, and an abundant pioneer species on young lava flows, which persists into late-succession where it maintains populations in climax rain forest (Strasberg 1995). Trees in such old forests may be more than 150-200 years old. *A. borbonica* produces small, tubular, white flowers which are pollinated by a range of insects (Lepidoptera, Diptera and Hymenoptera). Populations are functionally dioecious in early succession and subdioecious in late succession where the polliniferous morph has low levels of fruit set. The sex ratio is not significantly different from 1:1 in all of these populations except at site 13 where female trees are less common than hermaphrodites (Litrico et al. submitted ms). The mating system is thus likely to be highly outcrossing in all populations. Its reddish fleshy fruits are dispersed by birds, mostly native *Zosterops* spp. and introduced *Pycnonotus jocosus*.

Populations were sampled across the entire distribution of the study species. Thirteen populations were sampled on La Réunion in two main types of situation which differ dramatically in terms of current rates of population turnover (Fig. 1). First, nine of these populations occur in the Grand Brûlé on the south-east flanks of the Piton de la Fournaise volcano at <300m elevation, in a highly disturbed landscape where population extinction and re-colonization are frequent. In the last 300-400 years there have been eruptions roughly once every two – three years (Bachelery 1981 cited by Thébaud & Strasberg 1997). Of these nine populations, six (sites 1-6) are early succession populations and three (sites 7-9) are late-succession populations (forest fragments spared by lava flows during the last 100 years). Second, four populations (sites 10-13) were sampled outside the Grand Brûlé in less fragmented climax forest: one (site 10) at <300m elevation in the only remaining piece of

natural lowland tropical rain forest on La Réunion outside of the Grand Brûlé and three (sites 11-13) at 1000-1500m elevation away from the active caldera. The latter three sites occur at the altitudinal limits of the distribution of *A. borbonica* on La Réunion in a more stable landscape where volcanic activity ceased several thousand years ago, but where cyclonic perturbations frequently occur. In addition, one population (site 14) was also sampled on the sister island of Mauritius (~300km from La Réunion), in the Pétrin natural reserve.

### *Karyology*

The genus *Antirhea* is composed of about thirty species, almost all endemic to islands or with limited distribution in some mainland areas in the West Indies and Oceania. Only two species, in addition to *A. borbonica*, occur around the Indian Ocean: *A. madagascariensis* S.M. Chaw in Madagascar and *A. bifurcata* (Desr.) Hook. on the islands of Mauritius and Rodrigues. The chromosome number of all *Antirhea*'s species is unknown. We carried out a karyology study on 2, 3 and 2 individuals of *A. borbonica* in sites 4, 8 and 10 respectively, using the method described in Verlaque *et al.* (2002).

### *The microsatellite procedure*

A total of 366 mature individuals belonging to the 14 populations were sampled in 2004 (Table 1). Individuals were genotyped for seven of the ten polymorphic microsatellite loci described in Litrico *et al.* (2004). Due to the probable occurrence of null alleles at loci AntbT6F, AntbT10B, and AntbT7C, these loci were excluded from the analysis.

Microsatellite PCRs were processed using fluorescent-labelled primers, allowing PCR products to be simultaneously analysed on an ABI 3100 automated sequencer (Applied biosystems). Subsequent analysis was carried out using GeneScan Analysis ® 3.7 (Applied biosystems). Fourteen individuals were replicated to check repeatability. In addition, we

randomly sampled 177 seedlings in one early succession population on the 1943 lava flow (site 4). These seedlings were genotyped using the same protocol.

#### *The AFLP procedure*

Only mature individuals were analysed in 14 populations, a total of 226 individuals (all of which had been genotyped for microsatellite markers) were sampled for AFLP analysis in 2004 (Table 1). One individual per population was replicated. The precise AFLP protocol is described by Vos *et al.* (1995). Plant DNA was extracted from leaves using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, IMP). After digestion with *Eco*R1 and *Mse*1, adaptors were ligated on both ends of genomic fragments and the pre-amplification and selective amplification were performed. The selective primer pair was *Eco*R1: GACTGCGTACCAAATC.**CG** / *Mse*1: ATGAGTCCTGAGTAA.**C** (selective bases are in bold letters). We used the fluorescent-labeled selective primer *Eco*R1, allowing PCR products to be simultaneously analysed on an ABI 3100 automated sequencer (Applied biosystems). AFLP patterns were visualized with GeneScan Analysis ® 3.7 (Applied biosystems), and the loci were typed as present or absent.

#### DATA ANALYSIS

##### *Independence of markers*

Genotypic linkage disequilibrium was measured within each population and for each pair of loci using 1000 permutations implemented by GENETIX version 4.04 (Belkhir *et al.* 2001) for microsatellite markers. For AFLP markers, linkage disequilibrium was calculated with DDM "D (linkage disequilibrium) for Dominant Markers" version 0.1 (Berthier pers com.). DDM calculates for each couple of markers (A, B), the mean over individuals of the distance D between the allelic values at the two markers:

$$D_{\text{mean}}(A, B) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |v(A, i) - v(B, i)|$$

Where  $n$  is the number of individuals,  $v(A, i)$  the allelic value (0 or 1) of individual  $i$  for the marker  $A$ . To avoid redundancy, when the couple of markers had  $D_{\text{mean}} < 0.05$  or  $D_{\text{mean}} > 0.95$ , one was removed from the data set.

#### *Genetic diversity within populations*

Seedlings and mature individuals were independently analyzed. For microsatellite markers, we calculated the mean number of alleles per locus ( $n_a$ ), Nei's unbiased expected heterozygosity ( $H_e$ ) (Nei, 1978), observed heterozygosity ( $H_o$ ) and Wright's  $F_{is}$ -statistic according to Weir & Cockerham (1984) using GENETIX version 4.04 (Belkhir *et al.* 2001). The test for departure from Hardy-Weinberg equilibrium was conducted using 1000 permutations implemented by GENETIX version 4.04 (Belkhir *et al.* 2001). For AFLP markers, within population estimates were calculated using POPGENE software version 1.32 (Yeh & Boyle, 1997) using  $F_{is}$  values per population calculated for microsatellite loci. We calculated the number of polymorphic bands ( $N_b$ ), Nei's expected heterozygosity (Nei, 1973) ( $H_e$ ) and Shannon's Information Index ( $I_s$ ) (Lewontin, 1972). For both markers, Spearman's rank correlation coefficients were calculated to test for a relationship between estimates of genetic variability and population size.

#### *Differentiation among populations*

To facilitate the interpretation of patterns of among-population genetic differentiation, we classed populations into one of three groups. Group 1 contained the nine populations situated within the Grand Brûlé (where colonization and extinction are the recurrent features) while group 2 comprised the four populations from La Réunion which are situated outside the Grand Brûlé in a more stable landscape where populations are likely to be older. Group 3 contained all populations from La Réunion.  $F_{st}$  values were estimated among populations,

among group (1, 2, and 3) and between populations (by pair) for both microsatellite and AFLP markers. For microsatellite markers,  $F$ -statistics were calculated according to the Weir & Cockerham procedure (1984) and tested using 1000 permutations of individuals among populations or groups (GENETIX version 4.04, Belkhir *et al.* 2001). For AFLP data, we calculated among-population estimates of differentiation ( $F_{st}$  according to Lynch & Milligan 1994) using the overall  $F_{is}$  value estimated from microsatellite loci, and performed the permutation test (1000 random permutations of individuals among populations) for genetic differentiation using AFLP-SURV software (Vekemans, X. 2002. AFLP-SURV version 1.0.).

In order to test for isolation by distance (for both markers), correlations between genetic distances (measured as  $F_{st}$ ) and the spatial distance between pairs of populations were calculated and tested following the Mantel permutation procedure (GENETIX version 4.04, Belkhir *et al.* 2001). In addition, we conducted a multilocus regression  $F_{st} / (1-F_{st})$  estimate over distance for all pairs of populations. These regressions were computed using SPAGedi (Hardy & Vekemans 2002) for microsatellite and SAS (2001) for AFLP markers. In order to assess the population or group of origin of each individual, assignment tests were performed on the one hand on 366 individuals genotyped and on the other hand on 177 seedlings genotyped, with microsatellites according to Bayesian method of Rannala & Mountain (1997) and to the Distance method developed by Nei *et al.* (1983) using the GENECLASS package (Piry *et al.* 2004). For eight populations (site 1, site 3, site 4, site 5, site 7, site 8, site 10 and site 13), spatial autocorrelation analyses were conducted for microsatellite data using the pairwise kinship coefficient (Loiselle 1995) using the SPAGedi software (Hardy & Vekemans 2002). These analyses were not done with AFLP markers because population sample sizes were insufficient.

## Results

### *Karyology*

All studied *A. borbonica* individuals showed the same chromosome number  $2n = 4x = 44$ .

The small size of chromosomes ( $\sim 0.5 \mu\text{m}$ ) prevented us from establishing a karyotype diagram for this species. However, microsatellite genotyping indicates that chromosomes had a pairing behaviour. It is thus possible that this species has an allotetraploid constitution.

### *Independence of markers*

Linkage disequilibrium within populations was detected at the 5% level for twelve of the 294 possible tests for the microsatellite loci studied here. This value was less than expected by chance at the 5% level (14.7). From the 184 polymorphic AFLP fragments that could be used, 29 were removed ( $D_{\text{mean}} < 0.05$  or  $D_{\text{mean}} > 0.95$ ) from the data set prior to analysis. Analyses were thus conducted on a total of 155 polymorphic AFLP markers.

### *Genetic diversity within populations*

For mature individuals, the mean number of alleles per locus and per population for microsatellite markers was 7.14 and the mean number of alleles per locus varied from 2.2 to 4 (Table 1). Nei's expected heterozygosity values ranged from 0.339 to 0.481 with microsatellite markers, i.e. values which are fairly low for microsatellite markers, and from 0.168 to 0.276 for AFLP markers. Shannon diversity indices ranged from 0.2750 to 0.4268. Departures from Hardy-Weinberg equilibrium were observed in all populations; all  $F_{\text{is}}$  values were high and always significantly greater than zero. There was no difference between  $F_{\text{is}}$  values in early-succession populations (range from 0.16 to 0.42) and late-succession populations (range from 0.19 to 0.49). Sample sizes per population were however significantly correlated with  $F_{\text{is}}$  values for microsatellite markers ( $R_s = -0.56$ ,  $P < 0.05$ ) and



with Nei's expected heterozygosity and Shannon index for AFLP markers ( $R_S = 0.56$ ,  $P < 0.05$  and  $R_S = 0.61$ ,  $P < 0.05$  respectively). For AFLP markers, all diversity indexes were significantly correlated with one another: the number of polymorphic bands with both  $He$  ( $R_S = 0.68$ ,  $P < 0.01$ ) as well as  $I_s$  ( $R_S = 0.76$ ,  $P < 0.001$ ) and  $I_s$  with  $He$  ( $R_S = 0.97$ ,  $P < 0.001$ ). For the seedlings in site 4, the mean number of alleles was 4.57, a departure from Hardy-Weinberg equilibrium was observed and Nei's expected heterozygosity values were higher than observed heterozygosity, 0.5737 ( $\pm 0.1234$ ) and 0.3426 respectively. The  $F_{is}$  value of 0.4052 was significantly ( $P < 0.001$ ) different from zero. The superior  $F_{is}$  value estimated from the seedlings in comparison with mature individuals in this population may be due to a temporal effect, i.e. several generations in a given population sample.

#### *Genetic differentiation among populations*

For microsatellite loci, the multilocus  $F_{st}$  estimated over the whole set of populations was 0.10 ( $P < 0.001$ ) and 0.09 ( $P < 0.001$ ) when removing the Mauritius population. The multilocus  $F_{st}$  for the nine populations in the Grand Brûlé was significant ( $F_{st} = 0.04$ ,  $P < 0.0001$ ), but less than that for the four late-succession populations outside of the Grand Brûlé ( $F_{st} = 0.19$ ,  $P < 0.0001$ ). Genetic differentiation inside the Grand Brûlé was similar for early-succession (sites 1-6) populations ( $F_{st} = 0.04$ ,  $P < 0.001$ ) and late-succession (sites 7-9) populations ( $F_{st} = 0.04$ ,  $P < 0.001$ ). Hierarchical analyses showed only slight but significant differentiation ( $F_{st} = 0.0052$ ,  $P < 0.05$ ) between early and late-succession populations within the Grand Brûlé.

Similar results were detected for AFLP markers,  $F_{st} = 0.19$  ( $P < 0.001$ ) among all populations,  $F_{st} = 0.19$  ( $P < 0.001$ ) among all populations on La Réunion,  $F_{st} = 0.20$  ( $P < 0.001$ ) among all populations in the Grand Brûlé, and  $F_{st} = 0.22$  ( $P < 0.001$ ) among late-succession populations outside the Grand Brûlé on La Réunion (see also Table 2). Likewise, genetic differentiation inside the Grand Brûlé was similar for early-succession (sites 1-6)

populations ( $F_{st} = 0.20$ ,  $P < 0.001$ ) and late-succession (sites 7-9) populations ( $F_{st} = 0.15$ ,  $P < 0.001$ ). The higher values obtained with AFLP markers may probably reflect their dominant character which may cause them to over-estimate patterns of differentiation (Isabel *et al.* 1999, Kruvotovskii *et al.* 1999).

Neither microsatellite nor AFLP markers showed evidence for isolation by distance. The Mantel permutation test of the relation between multilocus  $F_{st}$  values and spatial distances among populations gave a non-significant result (microsatellite:  $Z = 2358.32$ ;  $P > 0.05$  and AFLP: ( $Z = 3485.89$ ;  $P > 0.1$ ), as did the multilocus regression of  $F_{st}$  over  $1 - F_{st}$  (microsatellite:  $P > 0.05$  and AFLP:  $P > 0.1$ ). In addition, we found no evidence for a negative relationship between spatial distance and kinship coefficients within populations since, for a given spatial distance, the kinship coefficient between pairs of individuals had highly variable values (Fig. 2). In other words, two individuals a given distance apart may or may not be genetically related.

Assignment tests were conducted using the Bayesian method and the Distance method which does not assume Hardy Weinberg equilibrium (Cornuet *et al.* 1999). When we proceeded to population assignment for mature individuals (Fig. 3a), 228 / 366 (62.3%) individuals were accurately assigned with the Bayesian method and 146 / 366 (39.9%) with the Distance method. Wrongly assigned individuals had a fairly equal probability of being assigned to a range of different populations. Population assignment for seedlings in site 4 showed that 84 / 177 (47.4%) individuals were assigned to the same site (site 4) with the Bayesian method and 63 / 177 (35.6%) with the Distance method (Fig 3b). When assignment tests for adult plants were performed using population groups 1 and 2 and Mauritius (site 14) as sources for assignment, 100% of individuals were correctly assigned with the Bayesian method and 76.8% with the Distance method (Fig. 4).

## DISCUSSION

Our study of the spatial genetic structure of populations of the pioneer woody species *Antirhea borbonica* in a matrix of early- and late-succession populations on the lava flows of the Grand Brûlé on La Réunion, and comparison with other populations in more stable habitats has produced two key results. First, early-succession populations had levels of genetic differentiation equivalent to that among older populations in caldera. Second,  $F_{is}$  values are high in all populations, despite the fact that this species should be highly outcrossing. Our discussion is focused on how different ecological processes associated with colonization and population establishment during primary succession and the mating system of this species contribute to these results. An important point to retain here is that, given the utility of analysing genetic diversity with different type of markers (Mariette *et al.* 2002), we detected similar patterns of variation for AFLP and microsatellite markers.

### No enhanced differentiation among pioneer populations

Within the Grand Brûlé, where population extinction and colonization are recurrent features of the population biology of all native species, estimates of genetic differentiation among early-succession populations are similar to those among late-succession populations of *Antirhea borbonica*. This result suggests that founder effects during colonization do not cause enhanced divergence among colonist populations, as reported previously in pioneer populations of *Silene* species in primary (Giles & Goudet 1997) and secondary (McCauley *et al.* 1995) successions. This may be due of the lack of marked spatial isolation between source fragments of forests and new lava flows.

The low levels of differentiation among populations in the Grand Brûlé, combined with the results of the assignment tests, indicate that the process of colonization of individual lava flows may involve different source populations located around the newly formed lava

flows. Indeed, ecological studies of re-colonization on the lava flows of the Grand Brûlé have shown that a wave of gradual colonization from the different margins towards the centre of new lava occurs for most species, including *A. borbonica* (Thébaud & Strasberg 1997; Prugnolle 1999). The study species is a frequent colonizer of early-succession habitats inside the Grand Brûlé where it is one of the most common species on a large number of lava flows (Strasberg 1994).

The only variation in levels of genetic differentiation detected in this study concerns the higher  $F_{st}$  values observed among the older late-succession populations outside of the Grand Brûlé on La Réunion. The greater spatial isolation of these populations may reduce gene flow among them and because they occur in different habitats on the slopes of both the older and now extinct Piton des Neiges volcano and the flanks of the Piton de la Fournaise (Fig. 1) differentiation may be further enhanced. In addition, outside of the Grand Brûlé and on Mauritius, the frequent cyclones that impact on natural forest may also contribute to reduce population size and enhance levels of differentiation among populations. Finally, differentiation may be high among late-succession populations if a process of biotype depletion occurs during succession (see Gray 1993) and if different genotypes are maintained in different sites.

A final result of interest concerning the patterns of differentiation among populations of *A. borbonica* is that the population on Mauritius does not appear to be more genetically distinct from populations on La Réunion than are the latter among themselves. This result strongly suggests that the colonization of La Réunion (which was formed at ~3Ma) was from Mauritius (formed at ~8Ma) and that this colonization did not involve a strong founder effect on diversity. Once again our results attest to the lack of a strong founder event, even after long-distance colonization.

### Why are $F_{is}$ values consistently high?

A key result of this study is that  $F_{is}$  values are significant in all populations, despite the fact that this species probably has a predominantly outcrossing mating system. In early-succession populations are dioecious and in late-succession polliniferous plants have low fruit set and seeds of relatively low vigour compared to those of females (Litrico *et al.* submitted ms). Sex ratios are close to 50:50 in all but one population (site 13 where females are at a lower frequency). This would suggest that the high  $F_{is}$  values are due to other causes than inbreeding *per se*.

The consistently high  $F_{is}$  values may be driven by the ecological processes associated with dispersal and colonization in pioneer populations which may create localised spatial structure within populations. Together, the joint effects of dispersal limitation, nucleation and facilitation can significantly affect the spatial pattern of colonization of open areas by fleshy-fruited species in other regions where the process of secondary succession is operating (Debussche & Lepart 1992; Debussche & Isenmann 1994; Herrera *et al.* 1994) and for herbaceous and woody species which establish pioneer populations in other situations of primary succession (Wood & del Moral 1987; Drake & Mueller-Dombois 1993). In primary succession, dispersal limitation may be observed over extremely short distances due to the stressful nature of the habitat (Del Moral 1993; Lichter 2000). For example, on Mount St Helens, Wood & Del Moral (1987) reported that the species capable of establishing at a given site are those which are the slowest to get there due to their lack of any capacity for rapid and recurrent dispersal away from a source population.

A critical point to note here is that the distribution of *A. borbonica* in several early- and late-succession populations shows significant spatial aggregation. For example, spatial aggregation has been detected in three out of four studied populations on the 1943 lava flow (Prugnolle 1999, Litrico 2001) where three of our study populations occur, in one of the two

late-succession forest fragments (200-300 years old) in the Grand Brûlé (I. Litrico unpublished data) and in one out of three plots in the Mare-Longue nature reserve (J. Gilles, F. Prugnolle & D. Strasberg unpublished data), where our study site 10 occurs. The fact that not all sites show spatial aggregation may be due to the small size of some of the plots. Several processes associated with dispersal and establishment in primary succession may influence the development of this spatial structure and consequently the occurrence of high  $F_{is}$  values in our study.

First, spatial pattern is likely to be enhanced by dispersal limitation. As mentioned above, colonization occurs gradually from the forest edges which border lava flows in towards the centre, as witnessed by a gradual decrease in abundance of plants of most species (Thébaud & Strasberg 1997), including *A. borbonica* (Prugnolle 1999), on transects from the edge to the centre of lava flows. In addition, for *A. borbonica*, a large majority of the fruit crop falls to the ground and shows very limited dispersal away from maternal parents (I. Litrico pers. obs). Seedling dispersal is thus spatially aggregated around other conspecific trees and adults of other species (particularly the wind-dispersed pioneer tree *Agauria salicifolia*) which provide perching points for birds - the study species is fleshy-fruited.

Second, seed germination and seedling establishment are likely to be strongly limited by the availability of suitable microsites on the open lava. On the lava flows of the Grand Brûlé, the establishment of pioneer species such as *A. borbonica* is limited to cracks and depressions in the rock where some organic matter can accumulate and where roots can penetrate fissures in the lava (pers. obs.).

Third, nurse effects of adult plants may facilitate seedling establishment via reduced water and nutrient stress under their canopies and in their litter. Such facilitation is considered to be an essential element of the process of primary succession (Connell & Slatyer 1977; Callaway *et al.* 1990, Bertness & Callaway 1994) and probably enhances nucleation and

spatial aggregation of pioneer plants, such as our study species, on the lava flows of La Réunion.

Fourth, in *A. borbonica* spatial aggregation in pioneer populations is likely to be greatly enhanced by the dioecious mating system of this species which causes seed production and seedling abundance to be highly aggregated, i.e. on and under female trees (I. Litrico, unpublished data). This spatial aggregation may come at a cost if competition is enhanced under female plants, the so-called seed shadow handicap for dioecious species (Heilbuth *et al.* 2001). However, the benefits of a nurse effect in pioneer populations may outweigh this cost, as proposed for other situations of primary succession on volcanic lava (Wood & del Moral 1987).

The above discussion of spatial aggregation and high  $F_{is}$  values in populations of *A. borbonica* suggests that colonization is at least in part associated with kin-structured colonization. This occurs when relatives, rather than a random sample of individuals, are dispersed and colonize together (Levin 1988). In *A. borbonica* the spatial aggregation under females and the limited dispersal from source trees onto the edges of new lava and the subsequent gradual encroachment across lava flows are indicative that kin-structured colonization may be a feature of the colonization process on newly formed lava. Studies of other pioneer species in which unisexual female individuals are the principal seed producers in a population also suggest population subdivision as a result of the establishment of family groups around females, e.g. in *Silene dioica* (Giles *et al.* 1998) and *Thymus vulgaris* (Manicacci *et al.* 1996; Tarayre & Thompson 1997). The fact that for a given spatial distance individuals in a population are either genetically very similar or very different suggests that in some parts of a population individuals are closely related but in others (for example, where waves of colonization meet) are genetically distinct. Additional support for the idea that family structure within individual populations may occur on population level has been

observed in a parallel study of genotyped seedlings in one population on the 1943 lava flow where assignment tests showed that a majority of seedlings is assigned to this population, i.e. they are little the result of new colonization events.

In conclusion, our study implicates a role for different ecological process and the mating system for the development of spatial genetic sub-structure in early-succession populations of *A. borbonica*. The fact that significant  $F_{is}$  values were detected even in late-succession populations suggests that the ecological processes which shape the genetic structure of pioneer populations of *A. borbonica* have a lasting effect on the spatial distribution of genetic variation in populations of this species. Such a long-lasting effect of initial processes operating during colonization has been suggested in populations of other woody species that colonize open areas (e.g. Herrera *et al.* 1994). We thus conclude by emphasising the need for a strong appreciation of the ecological processes involved in migration and colonization and the crucial impact of the initial dispersal and colonization events for the interpretation of spatial patterns of genetic variation along gradients of primary succession, and thus in an aged-structured metapopulation context. It would be interesting to evaluate whether such processes are general features of long-lived woody species populations in aged-structured populations in spatially variable environments.



**Acknowledgements**

We thank the C.N.R.S., the Université de La Réunion and the Région de La Réunion for financial support. We thank Marie Maistre, Anabelle Dos Santos, Geneviève Debussche, the marker genetics teams at the Pôle de Protection des Plantes de La Réunion and at the CEFECNRS in Montpellier, particularly Emmanuelle Chapier and Emmanuel Jouen, for practical help. We thank Marie-Hélène Chevalier, Florence Nicole and Aurélie Bonin for help with software and Thierry Pailler for advice and encouragement.

## References

- Austerlitz F, Jung-Muller B, Godelle B, Gouyon PH (1997) Evolution of coalescence times, genetic diversity and structure during colonization. *Theoretical population biology* **51**, 148-164.
- Barrett SCH (1996) The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical transactions of the Royal Society series B* **351**, 725-733.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2001) GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions; CNRS UMR 5000; Université Montpellier II, Montpellier (France).
- Bertness MD, Callaway R (1994) Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* **9**, 191-193.
- Cadet T (1977) *Contribution à l'étude de la végétation de l'île Rodrigue (Océan Indien)* PhD Thesis, University of La Réunion.
- Callaway RM, Jones S, Ferren WR J, Parikh A (1990) Ecology of a Mediterranean-climate estuarine wetland at Carpinteria, California: plant distributions and soil salinity in the upper marsh. *Canadian Journal of Botany* **68**, 1139-1146.
- Connell JH, Slatyer RO (1977) Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *American Naturalist* **111**, 1119-1144.
- Cornuet JM, Piry S, Gordon L, Estoup A, Solignac M (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* **153**, 1989-2000.
- Debussche M, Isenmann P (1994) Bird-dispersed seed rain and seedling establishment in patchy Mediterranean vegetation. *Oikos* **69**, 414-426.
- Debussche M, Lepart J (1992) Establishment of woody plants in Mediterranean old fields: opportunity in space and time. *Landscape Ecology* **6**, 133-145.

- Del Moral R (1993) Mechanisms of primary succession on volcanoes: A view from Mt. St Helens. In: *Primary Succession on Land* (eds. Miles J, Walton DWH), pp. 79-100. Blackwell Scientific, Oxford.
- Drake DR, Mueller-Dombois D (1993) Population development of rain forest trees on a chronosequence of Hawaiian lava flows. *Ecology* **1012-1019**.
- Giles BE, Goudet J (1997) Genetic differentiation in *Silene dioica* metapopulations: Estimation of spatiotemporal effects in a successional plant species. *American Naturalist* **149**, 507-526.
- Giles BE, Lundqvist E, Goudet J (1998) Restricted gene flow and subpopulation differentiation in *Silene dioica*. *Heredity* **80**, 715-723.
- Gray AJ (1993) The vascular plant pioneers of primary successions: Persistence and phenotypic plasticity. In: *Primary Succession on Land* (eds. Miles J, Walton DWH), pp. 179-191. Blackwell Scientific, Oxford.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual and population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618-620.
- Heilbuth JC, Ilves KL, Otto SP (2001) The consequences of dioecy for seed dispersal: modeling the seed-shadow handicap. *Evolution* **55**, 880-888.
- Herrera J, Jordano P, Lopez-Soria L, Amat JA (1994) Recruitment of a mast-fruiting, bird-dispersed tree: bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecological Monographs* **64**, 315-344.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnaean Society* **58**, 247-276.
- Husband BC, Barrett SCH (1996) A metapopulation perspective in plant population biology. *Journal of Ecology* **84**, 461-469.

- Isabel N, Beaulieu J, Thériault P, Bousquet J (1999) Direct evidence for biased gene diversity estimated from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* **8**, 477-483.
- Krivotovskii KV, Erofeeva SY, Aagaard JE, Strauss SH (1999) Simulation of effects of dominance on estimates of population genetic diversity and differentiation. *Journal of heredity* **90**, 499-502.
- Le Corre V, Kremer A (1998) Cumulative effects of founding events during colonization on genetic diversity and differentiation in an island and stepping stone model. *Journal of Evolutionary Biology* **11**, 795-512.
- Levin DA (1988) Consequences of stochastic elements in plant migration. *American Naturalist* **132**, 643-651.
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. In: *Evolutionary Biology* (eds. Dobzhansky TH, Hecht MK, Steere WC), pp. 381-397. Appleton-century-Crofts, New York.
- Lichter J (2000) Colonisation constraints during primary succession on coastal Lake Michigan sand dunes. *Journal of Ecology* **88**, 825-839.
- Litrice I (2001) *Dynamique de la re-colonisation et variation des traits biologiques et du système de reproduction chez une espèce pionnière : Le cas d'Antirhea borbonica sur les coulées de lave à La Réunion* Diplôme d'Etudes Approfondies, University of Montpellier II.
- Litrice I, Gilles J, Sourrouille P, Vignes H (2004) Isolation of ten polymorphic microsatellite loci from *Antirhea borbonica* (Rubiaceae). *Molecular Ecology Notes*. (in press)

- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understorey shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **82**, 1420-1425.
- Lynch M, Milligan G (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**, 91-99.
- Manicacci D, Couvet D, Belhassen E, Gouyon PH, Atlan A (1996) Founder effects and sex ratio in the gynodioecious *Thymus vulgaris* L. *Molecular Ecology* **5**, 63-72.
- Mariette S, Le Corre V, Austerlitz F, Kremer A (2002) Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology* **11**, 1145-1156.
- McCauley DE (1991) Genetic consequences of local population extinction and recolonisation. *Trends in Ecology and Evolution* **6**, 5-8.
- McCauley D, Raveill J, Antonovics J (1995) Local founding events as determinants of genetic structure in a plant metapopulation. *Heredity* **75**, 630-636.
- McCauley DE, Olson MS, Taylor DR (2001) An association between chloroplast DNA haplotype and gender in a plant metapopulation. *Evolutionary Ecology* **14**, 181-194.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 3321-3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* **19**, 153-170.
- Petit RJ, Pineau E, Demesure B, *et al.* (1997) Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9996-10001.

- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM *et al.* (2004) GeneClass2: a software for genetic assignment and first generation migrants detection. *Journal of heredity*.(in press)
- Prugnolle F (1999) *Dynamique des populations et biologie de la reproduction d'Antirhea borbonica Gmel. (Rubiaceae) dans un paysage fragmenté à l'île de La réunion : implications pour la biologie de la conservation de la forêt tropicale humide de basse altitude* Diplôme d'Etudes Approfondies, University of Paris.
- Rannala B, Mountain JL (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Genetics* **94**, 9197-9201.
- SAS Institute Inc. (2001). SAS/STAT Software Release 8.2. Cary, NC, SAS Institute Inc.
- Slatkin M (1977) Gene flow and genetic drift in a species subject to frequent local extinction. *Theoretical population biology* **12**, 253-262.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Strasberg D (1994) *Dynamique des forêts tropicales de l'île de La Réunion, processus d'invasion et de régénération sur les coulées volcaniques* PhD Thesis, University of Montpellier II.
- Strasberg D (1995) Processus d'invasion par les plantes introduites à La Réunion et dynamique de la végétation sur les coulées volcaniques. *Ecologie* **26**, 169-180.
- Tarayre M, Thompson JD (1997) The population genetic structure of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *Journal of Evolutionary Biology* **10**, 157-174.
- Thébaud C, Strasberg D (1997) Plant dispersal in fragmented landscapes: a field study of woody colonization in rainforest remnants of the Mascarene archipelago. In: *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*.

- (eds. Laurence WF, Bierregaard RO), pp. 321-332. Chicago University Press, Chicago.
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0 Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgique.
- Verlaque R, Aboucaya A, Friedlender A (2002) Les xénophytes envahissants en France : écologie, types biologiques et polyploïdie. *Botanica Helvetica* **112**, 121-136.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**., 4407-4414.
- Wade MJ, McCauley DE (1988) Extinction and recolonisation: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution* **42**, 995-1005.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**.
- Whitlock MC, McCauley DE (1990) Some population genetic consequences of colony formation and extinction: Genetic correlations within founding groups. *Evolution* **44**, 1717-1724.
- Wood DM, Del Moral R (1987) Mechanisms of early primary succession in subalpine habitats on Mount St Helens. *Ecology* **68**, 780-790.
- Yeh FC, Boyle TJB (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129-157.

## Figure legends

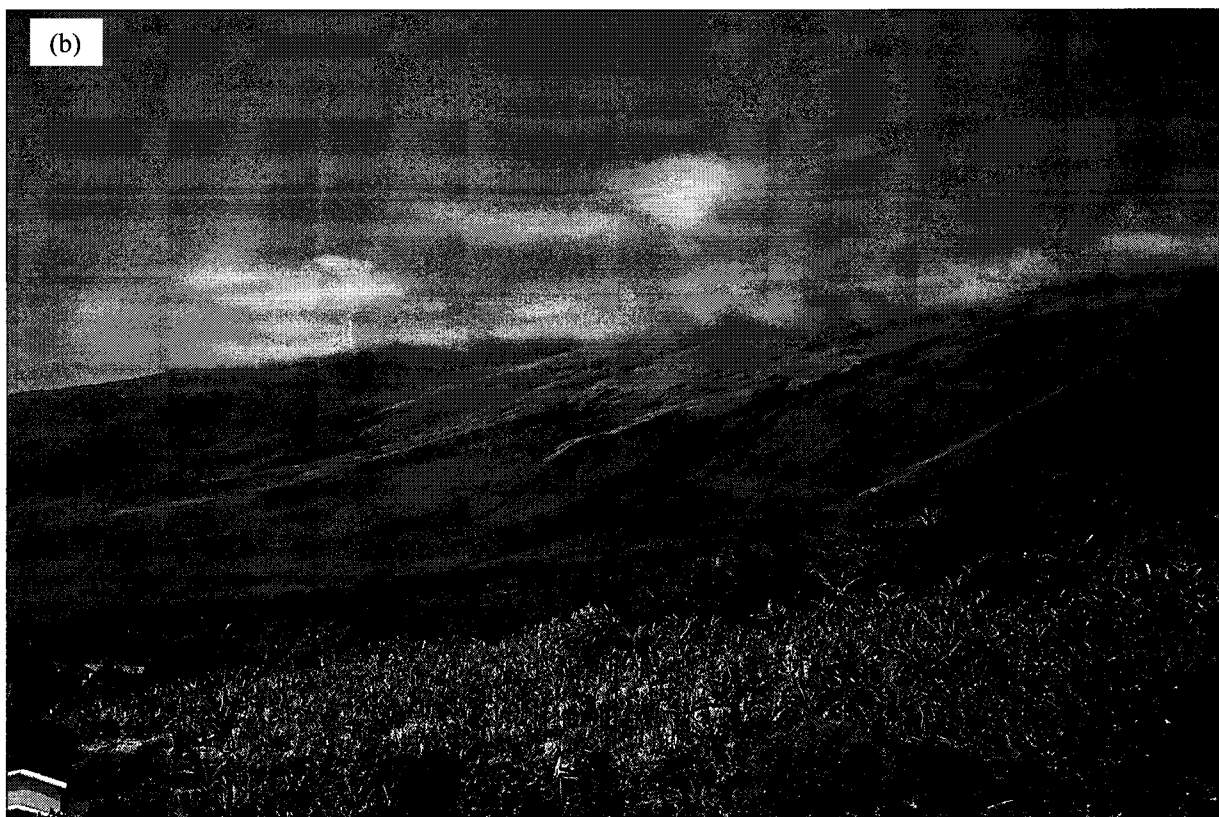
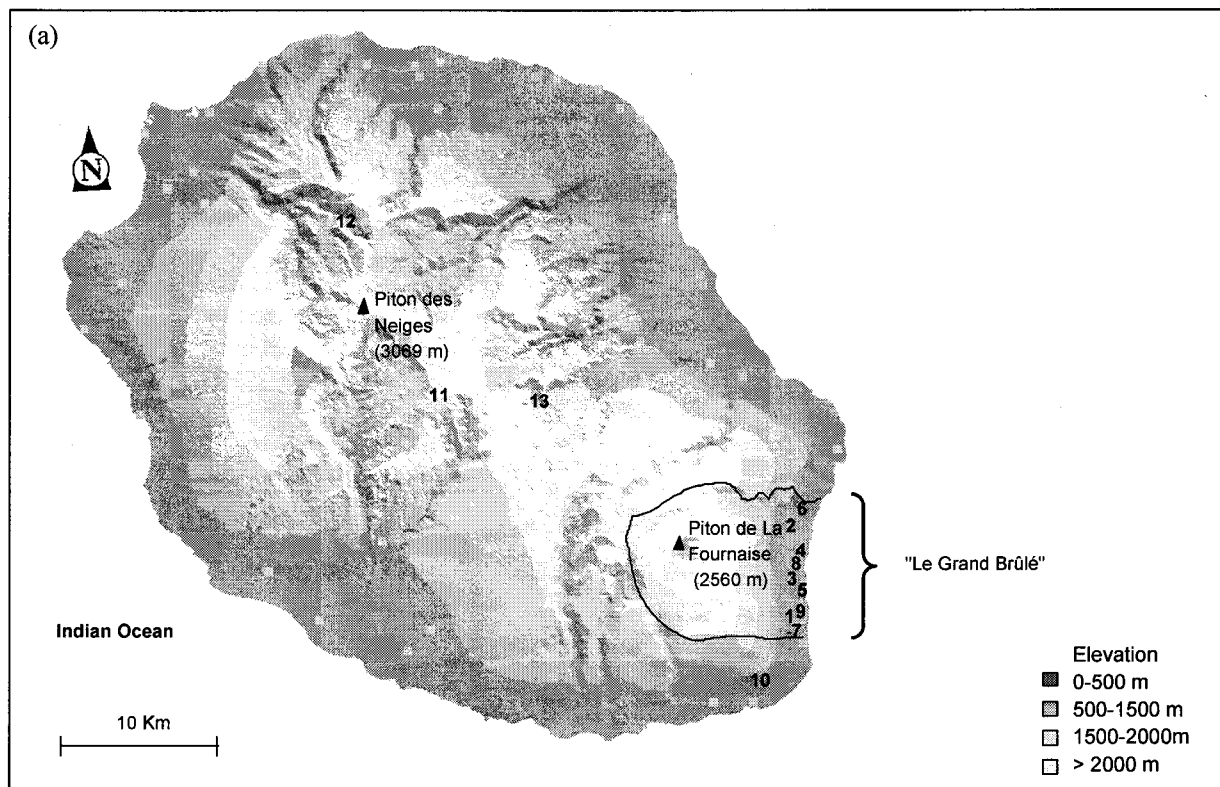
**Fig. 1** The location of study sites of *Antirhea borbonica* on La Réunion. (a) Location of the Grand Brûlé area and sites on La Réunion, (b) a panoramic view of the Grand Brûlé study area showing intact forest, new lava flows (in black) and recent lava flows colonised by lichens and ferns (grey).

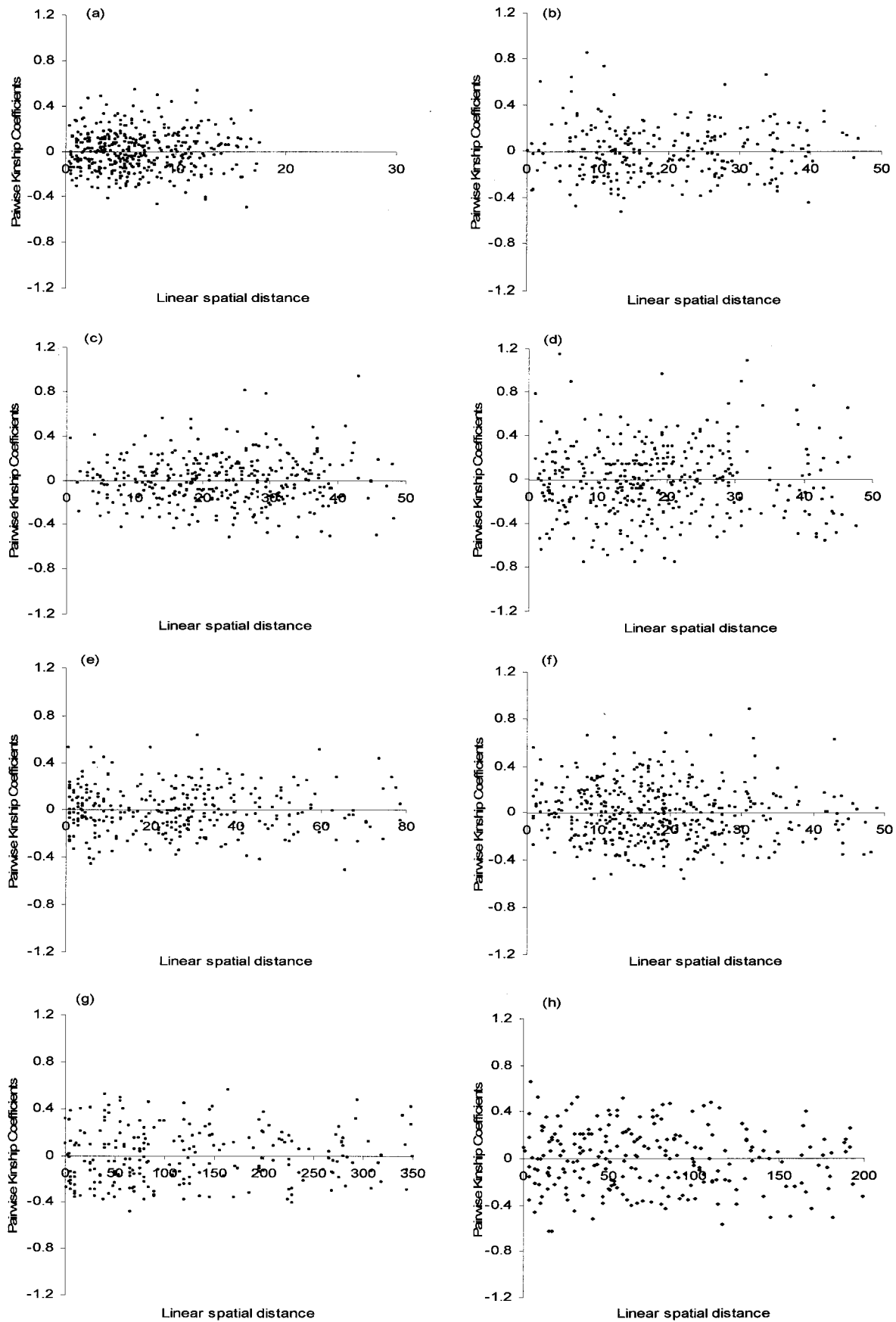
**Fig. 2** Spatial autocorrelation values within eight populations of *Antirhea borbonica* on La Réunion Island, (a) site 1, (b) site 3, (c) site 4, (d) site 5, (e) site 7, (f) site 8, (g) site 10, (h) site 13.

**Fig. 3** Percentage of correctly assigned individuals using the Bayesian (open bars) and Distance methods (closed bars). (a) The percentage of mature individuals correctly assigned into each population and (b) the percentage of seedlings at site 4 correctly assigned into this site.

**Fig. 4** Percentage of mature individuals correctly assigned into group 1, group 2 or Mauritius (site 14), using either the Bayesian method (open bars) or the distance method (closed bars).



**Fig. 1**

**Fig. 2**

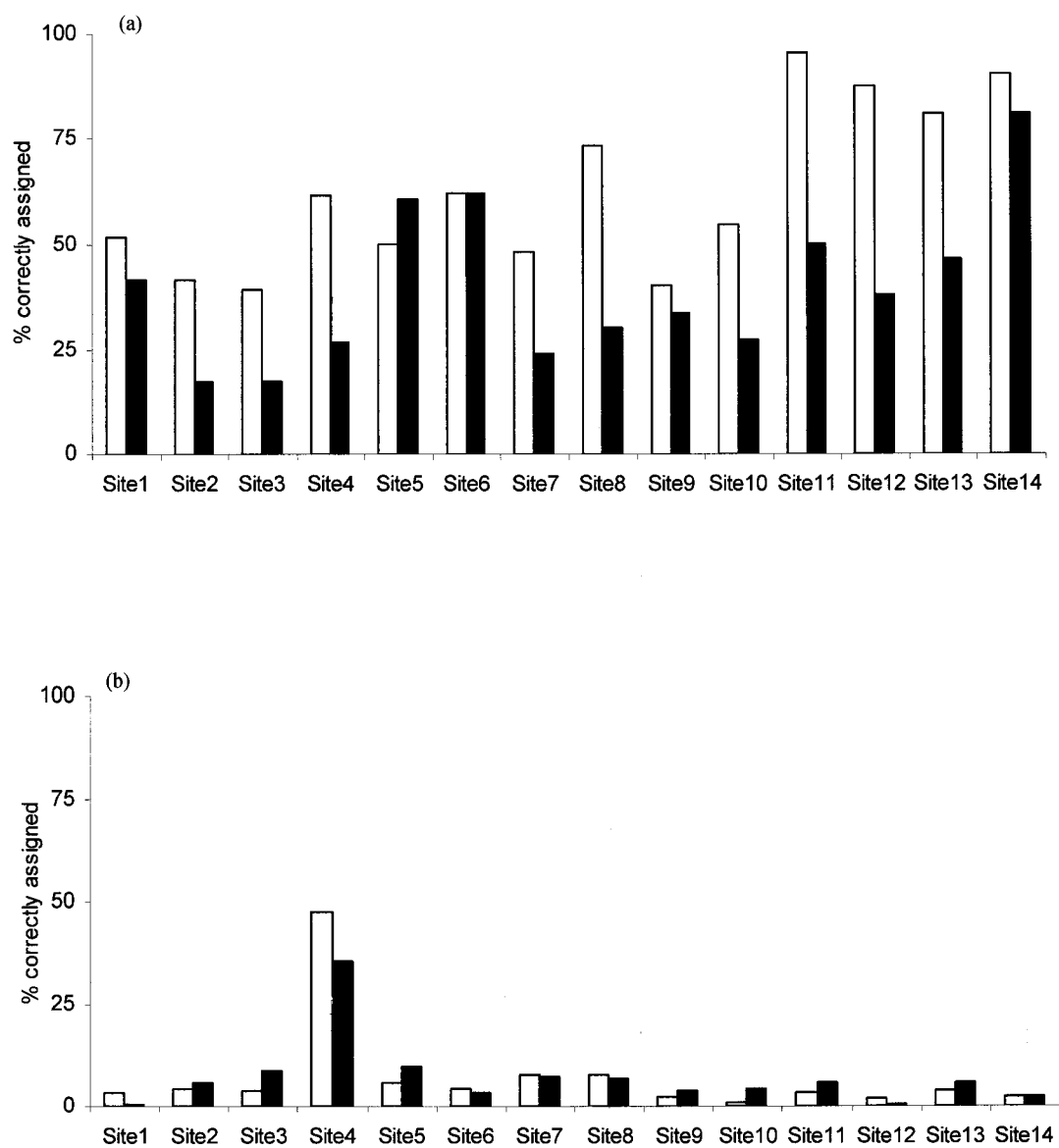
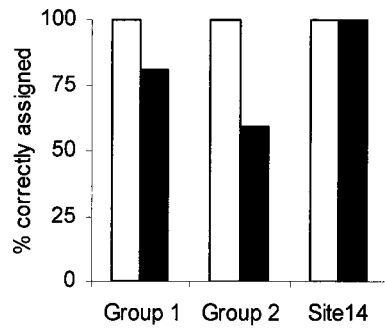


Fig. 3

**Fig. 4**

**Table 1** Mean ( $\pm$  SE) number of alleles per locus ( $N_a$ ), Nei's diversity ( $H_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ),  $F_{is}$ , the number of polymorphic AFLP bands ( $N_b$ ) and the Shannon diversity index ( $I_s$ ) from mature individuals in populations of *Antirhea borbonica*. Sites 1-6 are early-succession populations in the Grand Brûlé, sites 7-14 are late-succession populations in Le Grand-Brûlé (7-9), outside of Le Grand Brûlé (10-13) and on Mauritius (14).

| Site number | Date of lava flow | Successional status | MICROSATELLITE LOCI |        |                 |        |          | AFLP MARKERS |       |                 |                 |
|-------------|-------------------|---------------------|---------------------|--------|-----------------|--------|----------|--------------|-------|-----------------|-----------------|
|             |                   |                     | Sample size         | $N_a$  | $H_e$           | $H_o$  | $F_{is}$ | Sample Size  | $N_b$ | $H_e$           | $I_s$           |
| 1           | 1976              | early               | 29                  |        | 0.4809 (0.2386) | 0.3634 | 0.26***  | 19           | 88.39 | 0.2276 (0.1668) | 0.3602 (0.2238) |
| 2           | 1961              | early               | 29                  |        | 0.4452 (0.1678) | 0.3797 | 0.16***  | 19           | 94.84 | 0.2763 (0.1621) | 0.4268 (0.2100) |
| 3           | 1943              | early               | 23                  | 4.0000 | 29              | 3.8571 | 0.38***  | 19           | 85.81 | 0.2563 (0.1645) | 0.3969 (0.2252) |
| 4           | 1943              | early               | 26                  | 3.5714 | 29              | 3.4286 | 0.22***  | 12           | 87.74 | 0.2464 (0.1601) | 0.3865 (0.2166) |
| 5           | 1943              | early               | 28                  | 2.2000 | 0.3396 (0.2310) | 0.2021 | 0.42***  | 14           | 72.90 | 0.1677 (0.1512) | 0.2750 (0.2197) |
| 6           | 1931              | early               | 21                  | 2.8333 | 0.4789 (0.1838) | 0.3066 | 0.38***  | 11           | 74.84 | 0.2143 (0.1726) | 0.3351 (0.2437) |
| 7           | 100-300 yrs       | late                | 25                  | 2.8571 | 0.4525 (0.1971) | 0.3312 | 0.28***  | 15           | 87.10 | 0.2134 (0.1448) | 0.3461 (0.2011) |
| 8           | 100-300 yrs       | late                | 30                  | 3.1429 | 0.4170 (0.1960) | 0.2805 | 0.34***  | 16           | 88.39 | 0.2319 (0.1516) | 0.3698 (0.2066) |
| 9           | 100-300 yrs       | late                | 30                  | 3.4286 | 0.4103 (0.2293) | 0.3362 | 0.19***  | 20           | 91.61 | 0.2449 (0.1590) | 0.3858 (0.2125) |
| 10          | ~ 500 yrs         | late                | 22                  | 3.1429 | 0.4558 (0.2382) | 0.2619 | 0.44***  | 9            | 74.84 | 0.2199 (0.1744) | 0.3424 (0.2448) |
| 11          | > 500 yrs         | late                | 22                  | 2.7143 | 0.4085 (0.2625) | 0.3117 | 0.25***  | 13           | 87.74 | 0.2154 (0.1555) | 0.3468 (0.2108) |
| 12          | > 500 yrs         | late                | 24                  | 3.1429 | 0.4171 (0.1941) | 0.2174 | 0.49***  | 16           | 90.32 | 0.2517 (0.1485) | 0.3971 (0.2004) |
| 13          | > 500 yrs         | late                | 26                  | 2.5714 | 0.3703 (0.1846) | 0.2560 | 0.32***  | 23           | 85.16 | 0.2404 (0.1648) | 0.3760 (0.2260) |
| 14          | > 500 yrs         | late                | 31                  | 3.2857 | 0.3792 (0.2119) | 0.3024 | 0.21***  | 20           | 90.32 | 0.2720 (0.1666) | 0.4179 (0.2231) |

\*\*\*  $P < 0.001$

**Table 2** Pairwise  $F_{st}$  values (non-significant estimates are in *italic*) estimated from mature individuals among populations of *Antirhea borbonica* on La Réunion and Mauritius based on polymorphic microsatellite loci (upper matrix) and AFLP (lower matrix) markers.

| Site number | Date of lava flow | Successional status | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9      | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    |
|-------------|-------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1           | 1976              | early               | -     | 0.007 | 0.037 | 0.012 | 0.043 | 0.101 | 0.008 | 0.050 | 0.022  | 0.090 | 0.086 | 0.134 | 0.071 | 0.138 |
| 2           | 1961              | early               | 0.018 | -     | 0.020 | 0.019 | 0.062 | 0.096 | 0.005 | 0.049 | -0.002 | 0.112 | 0.082 | 0.127 | 0.122 | 0.148 |
| 3           | 1943              | early               | 0.105 | 0.066 | -     | 0.035 | 0.055 | 0.095 | 0.007 | 0.052 | 0.007  | 0.067 | 0.052 | 0.119 | 0.041 | 0.074 |
| 4           | 1943              | early               | 0.106 | 0.065 | 0.066 | -     | 0.001 | 0.101 | 0.007 | 0.058 | 0.029  | 0.076 | 0.105 | 0.148 | 0.061 | 0.152 |
| 5           | 1943              | early               | 0.292 | 0.218 | 0.148 | 0.139 | -     | 0.167 | 0.043 | 0.050 | 0.046  | 0.118 | 0.076 | 0.116 | 0.033 | 0.166 |
| 6           | 1931              | early               | 0.397 | 0.324 | 0.322 | 0.296 | 0.382 | -     | 0.091 | 0.064 | 0.103  | 0.022 | 0.144 | 0.213 | 0.124 | 0.127 |
| 7           | 100-300 yrs       | late                | 0.220 | 0.152 | 0.078 | 0.093 | 0.045 | 0.327 | -     | 0.051 | 0.012  | 0.088 | 0.090 | 0.129 | 0.072 | 0.121 |
| 8           | 100-300 yrs       | late                | 0.292 | 0.217 | 0.018 | 0.153 | 0.182 | 0.114 | 0.145 | -     | 0.052  | 0.129 | 0.116 | 0.174 | 0.132 | 0.173 |
| 9           | 100-300 yrs       | late                | 0.328 | 0.250 | 0.244 | 0.211 | 0.287 | 0.034 | 0.242 | 0.045 | -      | 0.130 | 0.089 | 0.127 | 0.140 | 0.164 |
| 10          | ~ 500 yrs         | late                | 0.084 | 0.068 | 0.081 | 0.060 | 0.234 | 0.361 | 0.175 | 0.235 | 0.283  | -     | 0.217 | 0.228 | 0.102 | 0.108 |
| 11          | > 500 yrs         | late                | 0.106 | 0.068 | 0.048 | 0.028 | 0.140 | 0.326 | 0.092 | 0.175 | 0.240  | 0.048 | -     | 0.181 | 0.180 | 0.245 |
| 12          | > 500 yrs         | late                | 0.144 | 0.095 | 0.054 | 0.036 | 0.061 | 0.309 | 0.042 | 0.134 | 0.220  | 0.097 | 0.029 | -     | 0.248 | 0.276 |
| 13          | > 500 yrs         | late                | 0.385 | 0.306 | 0.315 | 0.289 | 0.383 | 0.052 | 0.328 | 0.132 | 0.047  | 0.344 | 0.324 | 0.313 | -     | 0.286 |
| 14          | > 500 yrs         | late                | 0.103 | 0.070 | 0.080 | 0.032 | 0.223 | 0.318 | 0.151 | 0.203 | 0.241  | 0.047 | 0.075 | 0.960 | 0.306 | -     |



## ABSTRACT

Natural and human-induced disturbance cause both the destruction and fragmentation of natural habitats. Whereas habitat destruction creates new conditions and thus modifies local selection pressures, fragmentation modifies the size and spatial organisation of natural habitats, which in turn alters the potential for gene flow and the spatial organisation of genetic variation. On the island of La Réunion, habitat destruction and fragmentation associated with volcanic eruptions and lava flows on the flanks of the Piton de la Fournaise volcano, have created an appropriate situation in which to study the evolution of biological traits and genetic diversity as a result of natural disturbance. In this area a gradient of primary succession associated with plant colonisation on lava flows can be identified. The purpose of this study is to examine the variability of the reproductive system and the spatial organisation of genetic diversity in relation to the ecological processes associated with colonisation and succession in this system. The study species, *Antirhea borbonica*, is a pioneer fleshy-fruited woody species which persists into late-successional habitats. This species shows marked variation in the expression of dioecy among early- and late-succession habitats. Whereas previous theoretical work on the "seed shadow" and "reproductive assurance" hypotheses predicts a trend for hermaphroditism in pioneer populations and unisexuality in late-succession, our study revealed a contrasting pattern of strict dioecy in early-succession and the presence of high fruit set on polliniferous plants in late-succession. Experimental resource addition provides evidence that this variation is due to resource limitation in early-succession. Our theoretical models predict that hermaphroditism should be favoured in the presence of high among-seedling competition in high-resource environments, even in the presence of high rates of selfing and significant inbreeding depression. The gender variation in the polliniferous morph of *A. borbonica* could thus represent a form of adaptive plasticity. However, in this species, the functional contribution of gametes to subsequent generations via seed production on the polliniferous morph appears to be almost negligible in late-succession. All populations of this species are thus close to strict functional dioecy, which appears to be leaky in late-succession environments. Based on microsatellite marker analysis, all populations have high inbreeding coefficients. The lack of any evidence that these high values are due to selfing indicates that they probably caused by several ecological process that cause spatial aggregation during colonisation: namely dispersal limitation, establishment in favourable microsites, clumping under female adults, clumping under other trees which act as perch posts for bird-dispersers and facilitation and nurse effects of other species. High  $F_{is}$  values are thus probably the result of a Wahlund effect associated with the colonisation process in primary succession.

**Keywords:** Succession, genetic diversity, colonisation, dioecy, resource, La Réunion Island, *Antirhea borbonica*



## RESUME

Les perturbations, d'origine anthropique ou naturelle, entraînent deux phénomènes : la destruction et la fragmentation des habitats. Alors que, la destruction des habitats cause des variations de milieu, modifiant ainsi les pressions de sélection locales sur les traits biologiques des espèces, la fragmentation modifie la taille et l'organisation spatiale des populations, ce qui peut altérer les flux géniques et la diversité génétique. A La Réunion, les coulées de lave du Piton de La Fournaise, entraînent la destruction et la fragmentation de l'habitat de la forêt tropicale humide de basse altitude. Cette situation est bien adaptée à l'étude de l'impact des perturbations sur l'évolution des traits biologiques et la diversité génétique. En effet, la colonisation par les espèces végétales constitue une série de succession primaire où le milieu est variable au cours du temps. L'objectif de cette étude est d'étudier la variabilité du système de reproduction et l'organisation spatiale de la diversité génétique en relation avec les processus écologiques associés à la colonisation et à la succession primaire. *Anthirea borbonica* est un arbre pionnier des coulées de lave qui persiste sur des stades tardifs de la succession. Cette espèce montre une variation dans l'expression de la dioécie en fonction du stade successional. Alors que sous l'effet de l'assurance à la reproduction ou du "seed shadow handicap", certains auteurs prédisent l'avantage à l'hermaphrodisme lors de la colonisation, notre étude montre un patron contradictoire à ces prédictions. Contrairement aux vieilles populations où les morphes pollinifères d'*A. borbonica* sont capables de fructifier, dans les jeunes populations les individus montrent une tendance à l'unisexualité. Nous avons montré expérimentalement que la capacité de fructification du morphe pollinifère était influencée par le niveau de ressources. Par ailleurs, nos résultats théoriques révèlent qu'en présence d'une compétition entre plantules, l'hermaphrodisme, même avec un fort taux d'autofécondation associé à une forte dépression de consanguinité, est favorisé quand les ressources du site augmentent. Ainsi, la plasticité du genre sexuel d'*A. Borbonica* pourrait représenter une forme de plasticité adaptative. Cependant, la contribution des morphes pollinifères via leur fonction femelle pourrait être négligeable chez cette l'espèce. *A. borbonica* semble fonctionner comme une espèce dioïque stricte dans toutes les populations échantillonnées. Ainsi, les fortes valeurs de  $F_{is}$  estimées à partir de marqueurs microsatellites ne trouvent pas d'explication dans le système de reproduction. Mais les processus associés aux successions primaires, à l'ornithochorie et à la dioécie, pourraient favoriser une structure spatiale agrégée des populations donc des croisements consanguins et un effet Walhund.

**Mots clés :** Succession, diversité génétique, colonisation, dioécie, ressources, La Réunion, *Antirhea borbonica*