

Sommaire

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	5
INTRODUCTION AU SUJET DE THESE.....	7
Contexte, objectifs et présentation du travail de thèse	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I) Les symbioses végétales : acteurs, origines, spécificité et reconnaissance.	16
1- La symbiose	16
2- Exemples de symbioses végétales	16
3- La symbiose mycorhizienne à arbuscules	18
3.2- Les partenaires de la symbiose.....	20
4- Les symbioses rhizobiums-Légumineuses	21
4.1- Apparition et évolution de la fixation d'azote	24
4.2- Origine de la symbiose	24
4.3- Les rhizobiums.	25
4.4- Taxonomie polyphasique dans le genre <i>Bradyrhizobium</i>	28
4.5-Les Légumineuses	29
5- Établissement de la symbiose rhizobium-Légumineuses	31
5.1-La spécificité de la symbiose	31
5.2-L'établissement de la symbiose.....	31
5.2.1-L'intérêt des protagonistes à l'établissement de la symbiose	31
5.2.2-La reconnaissance plante-bactérie	34
II) Adaptation des plantes et de leurs symbiotes à l'inondation et à la salinité	38
1- Tolérance des symbioses végétales à la salinité.....	38
1.1- Tolérance des plantes à la salinité	38
1.2- Rhizobiums et stress salin.....	39
1.3- Symbioses et stress salin	40
2- Tolérance des symbioses végétales à l'inondation.....	42
2.1- Tolérance des plantes à l'inondation.....	42
III) L'insularité : description et problématiques	46
1- Dynamique de la colonisation insulaire.....	46
2- L'insularité et son impact sur la structuration génétique des populations.....	47
2.1- Diversité génétique	49
2.2- La dérive génétique	49

2.3- La migration, la colonisation et la dispersion.....	50
2.4- La sélection naturelle.....	52
2.5-Risques d'extinction.....	52
IV) La Caraïbe : description, paléogéographie et diversité des Légumineuses.....	54
1- Paléogéographie et biogéographie des végétaux dans les néotropiques	54
1.1- De-100 millions d'années (milieu crétacée) à -5 Ma :	54
1.2- De -3 millions d'années (milieu du pléocène) à -30000 ans	56
1.3- De -26000 ans à nos jours	57
2- Colonisation de l'Amérique du Sud et de la Caraïbe par les végétaux.....	57
3- les Légumineuses dans la Caraïbe.....	58
V) Les forêts marécageuses à <i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq.	59
1.1- La forêt marécageuse à Pterocarpus, un écosystème en danger ?	59
1.2- Importance écologique de cette formation	62
2- <i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq.	62
CHAPITRE 1 : ECHANTILLONNAGE ET MARQUEURS GENETIQUES.....	66
I) Sites d'échantillonnage	67
La Guadeloupe	67
Deshaies.....	69
Le Moule.....	69
Belle-Plaine (Abymes).....	69
Marie Galante	71
Dominique.....	72
Guyane française.....	72
Porto Rico	72
2/ Plan d'échantillonnage	73
3/ Les marqueurs génétiques de l'étude	76
Séquences ITS	76
Microsatellites nucléaires.....	77
Microsatellites chloroplastiques	78
Introduction à la publication 1.....	80
Publication I.....	81
Isolation and characterization of microsatellite markers in <i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq.	81
CHAPITRE 2 : DIVERSITE GENETIQUE ET PHYLOGEOGRAPHIE CHEZ PTEROCARPUS OFFICINALIS JACQ DANS LA REGION CARAÏBE.....	86
Introduction à publication 2	87
Publication II	88
Pattern of genetic diversity of an insular tree species, <i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq., distributed in Caribbean zones : implication for its conservation	88

Capacité des graines de <i>Pterocarpus officinalis</i> à germer après flottaison des gousses en eau douce et en eau de mer.....	110
Introduction	110
Matériels et méthodes	111
Flux de graines et flux de pollen.....	111
Germination des graines après flottaison des gousses.....	111
Résultats.....	114
Ratio flux de pollen/flux de graines.....	114
Capacité germinative des graines après traitement des gousses.....	114
Pourrissement des graines issues de gousses en eau douce ou en eau salée	114
Temps de germination en fonction des traitements.....	115
Discussion et perspectives	118
Flux de gène par pollen/flux de gène par les graines.....	118
Viabilité des graines après flottaison des gousses.....	118
CHAPITRE 3 : DIVERSITE GENETIQUE DES <i>BRADYRHIZOBIUM</i> DE <i>P. OFFICINALIS</i> JACQ EN FORET MARECAGEUSE DANS LA REGION CARAÏBE	121
Introduction à la publication 3.....	122
Publication III	123
Genetic diversity patterns of Bradyrhizobium strains associated with <i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq. in continental and insular Caribbean zones.....	123
Résultats complémentaires, sur la diversité des bactéries symbiotiques isolées à partir de nodules de <i>P.officinalis</i>	136
Mise en collection des souches isolées	136
Récapitulatif des souches isolées	136
Diversité des <i>Bradyrhizobium</i> par électrophorèse en champ pulsé	136
Matériels et méthodes	137
Résultats et discussions	137
CHAPITRE 4 : ÉCOLOGIE DES MYCORHIZES A ARBUSCULES DE <i>PTEROCARPUS OFFICINALIS</i> LE LONG D'UN GRADIENT DE SALINITE EN FORET MARECAGEUSE	143
Introduction à la publication IV	144
Publication IV	145
Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree <i>Pterocarpus officinalis</i> along a salinity gradient.....	145
CHAPITRE 5 : ADAPTATION DES SYMBIOSSES FIXATRICES D'AZOTE ET MYCORHIZIENNES DE <i>PTEROCARPUS OFFICINALIS</i> A L'INONDATION	151
Introduction à la publication V	152
Publication V	153

Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in <i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq. seedlings	153
CHAPITRE 6: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	173
Diversité, dispersion et risque d'extinction chez <i>P.officinalis</i>	174
A la recherche des origines géographiques de <i>P.officinalis</i>	176
Caractérisation et biogéographie des bactéries associées à <i>P.officinalis</i>	177
Écophysiologie des symbioses chez <i>Pterocarpus officinalis</i> en milieux salé et inondé	181
VALORISATION DES TRAVAUX.....	184
Articles scientifiques	184
Participation à des colloques nationaux et internationaux	185
RÉFÉRENCES	187

Liste des figures

FIGURE 1. : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU FONCTIONNEMENT DES SYMBIOSES FIXATRICES D'AZOTE ET MYCORHIZIENNES.	17
FIGURE 1. : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU FONCTIONNEMENT DES SYMBIOSES FIXATRICES D'AZOTE ET MYCORHIZIENNES.	17
FIGURE 2. : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES MYCORHIZES (MOUSAIN 1989).	19
FIGURE 3. : MODES DE DIFFERENCIATION DES NODULES.	23
FIGURE 4. : ARBRE SIMPLIFIE DE LA FAMILLE DES LEGUMINEUSES	33
FIGURE 5. : INVASION DES POILS RACINAIRES ET INFECTION PAR UN RHIZOBIUM. (PERRET ET AL. 2000)	37
FIGURE 6. : COMPARAISON DES VOIES D'INFECTION CHEZ LES LEGUMINEUSES	45
FIGURE 7. : REPRESENTATION DE LA CARTE GEOLOGIQUE DE L'AMERIQUE CENTRALE A LA FIN DU CRETACE ET AU PALEOCENE	55
FIGURE 8. : NIVEAU MARIN RELATIF OBTENU PAR DATATION DES ISOTOPES D'OXYGENE CONTENUS DANS DES SEDIMENTS CORALLIENS A LA BARBADE	55
FIGURE 9. : CARTE DE LA CARAÏBE REPRESENTANT LES TERRES EMERGEES LORS DE LA DERNIERE PERIODE GLACIAIRE	55
FIGURE 9. : CARTE DE LA CARAÏBE REPRESENTANT LES TERRES EMERGEES LORS DE LA DERNIERE PERIODE GLACIAIRE	55
PHOTO 10. : FORET A <i>P. OFFICINALIS</i> EN PERIODE D'INONDATION	60
PHOTO 11. : FORET A <i>P. OFFICINALIS</i>	60
PHOTO 12. : PIC DE GUADELOUPE (<i>MELANERPES HERMINIERI</i>)	61
PHOTO 13. : <i>AECHMEA FLEMINGII</i>	61
PHOTO 14. : GOUSSE DE <i>P. OFFICINALIS</i>	61
FIGURE 15. : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA BIOLOGIE DE <i>PTEROCARPUS OFFICINALIS</i> JACQ	65
FIGURE 16. : SITES D'ECHANTILLONNAGE.	68
FIGURE 17. : LES SITES D'ECHANTILLONNAGE DANS LES FORETS MARECAGEUSES DE GUADELOUPE (D'APRES BOUCHON)	75
FIGURE 18. : LE TRANSECT ETUDIE DANS LA FORET MARECAGEUSE DE BELLE-PLAINE (ABYMES)	75
TABLEAU 19. : COMPARATIF DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES MICROSATELLITES NUCLEAIRES PAR RAPPORT A DEUX AUTRES MARQUEURS COURAMMENT UTILISES EN BIOLOGIE DES POPULATIONS : LES ALLOZYMES ET LES RAPDs (EXTRAIT DE JARNE ET LAGODA, 1996).	79

FIGURE 20. : CHROMATOGRAMME D'UNE SEQUENCE MICROSATELLITE (TA) ₆ (TG) ₁₂ VISUALISEE A L'AIDE DU LOGICIEL CHROMAS 1.45.	79
FIGURE 21. : GOUSSES MATURES DE <i>P. OFFICINALIS</i> (FORET DE FOLLE-ANSE A MARIE GALANTE)	113
FIGURE 22. : CAGE FLOTTANTE DANS LAQUELLE LES GOUSSES DE <i>P. OFFICINALIS</i> ONT SEJOURNE (PONTON DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE MARINE, GUADELOUPE)	113
FIGURE 23. : POURCENTAGE DE GRAINE DE <i>P.OFFICINALIS</i> AYANT GERME APRES TRAITEMENT DANS L'EAU DOUCE ET DANS L'EAU DE MER.	116
FIGURE 24. : POURCENTAGE DE GRAINE DE <i>P.OFFICINALIS</i> N'AYANT PAS GERME APRES TRAITEMENT DANS L'EAU DOUCE ET DANS L'EAU DE MER.	116
FIGURE 25. : TEMPS NECESSAIRE A LA GERMINATION DES GRAINES DE <i>P.OFFICINALIS</i> APRES TRAITEMENT A L'EAU DE MER ET A L'EAU DOUCE.	117
TABLEAU 26. : LISTE DES SOUCHES DE <i>BRADYRHIZOBIUM</i> ISOLEES DE NODULES DE <i>PTEROCARPUS OFFICINALIS</i> DANS DES FORETS MARECAGEUSES EN GUADELOUPE, MARTINIQUE, DOMINIQUE, GUYANE ET PORTO RICO.	139
FIGURE 27. : PROFILS DE DIGESTION AVEC L'ENZYME SPEI OBTENUS PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE DE SOUCHES BACTERIENNES INSULAIRES	141
FIGURE 27. : PROFILS DE DIGESTION AVEC L'ENZYME SPEI OBTENUS PAR ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE DE SOUCHES BACTERIENNES INSULAIRES	141
FIGURE 28. IMAGE SATELLITE PRESENTANT L'INDICE D'AEROSOL PRESENT DANS L'ATMOSPHERE HTTP://TOMS.GSFC.NASA.GOV/EPTOMS/EP.HTML	180
FIGURE 29. CARTE DES VENTS AU-DESSUS DE L'ATLANTIQUE LE 14 JUIN 1994 (METEO FRANCE) SOURCE R.H PETIT ET AL 2004	180

Introduction au sujet de thèse

Rapport-Gratuit.Com

La forêt marécageuse tropicale représente moins de 2% de la surface des terres émergées dans le monde (Cadamuro 1999). Selon la définition de l'UNESCO (1973), la caractéristique majeure de cette formation est de se développer sur un sol inondé en eau douce et en eau saumâtre, pendant une partie de l'année. L'inondation temporaire induit chez les végétaux des adaptations morphologiques comme les racines échasses chez *Sympiphonia globulifera*, les pneumatophores chez *Euterpe oleracea*, ou les contreforts chez *Pterocarpus officinalis*. Par leur prédominance, chacune de ces espèces végétales confère un facies particulier à la forêt marécageuse: le “manil” (*S. globulifera*) en Guyane, le palmier pinot (*E. oleracea*) en Guyane ou le “mangle-médaille” (*P. officinalis*) en Guadeloupe (Imbert et al. 1988; Schnell 1967; Trochain 1980).

La forêt marécageuse à *P. officinalis* est une formation remarquable des Caraïbes qui se développe sur des sols inondés ou temporairement inondés en arrière de la mangrove, en bordure de rivière et dans des dépressions humides en montagne (Eusse & Aide 1999; Imbert et al. 2000). Dans les Antilles, l'espèce peut représenter jusqu'à 80% de la strate arborée (Alvarez-Lopez 1990). La forêt marécageuse à *P. officinalis* est présente dans le Nord de la Dominique, à Porto Rico où elle couvre plus de 167 ha, et en Martinique où elle occupe 15 ha dans la forêt du Galion (Alvarez-Lopez 1990; Bacon 1990; Eusse & Aide 1999; Imbert & Leblond 2001). En Guadeloupe, la forêt marécageuse à *P. officinalis* couvre 2600 ha principalement le long des lagons du Petit et du Grand-Cul-de-Sac-Marin, mais aussi sporadiquement le long des côtes du Sud-Est, et à Marie-Galante (Imbert et al. 2000). Elle abrite deux espèces d'oiseaux endémiques et fait l'objet d'un statut de protection dans le cadre de la réserve naturelle du Grand-Cul-de-Sac-Marin (Bonhême et al. 1998). En milieu continental inondé et en particulier en Guyane française, *P. officinalis* ne représente guère plus de 25% de la strate arborée (Koponen et al. 2003). Cet arbre est actuellement exploité par les Saramacas de Guyane qui l'ont adopté pour ses qualités remarquables dans l'artisanat.

Les forêts marécageuses à *P. officinalis* sont peu connues que ce soit en ce qui concerne leur structure que leur dynamique en particulier dans le milieu insulaire (Imbert et al. 2000; Rivera-Ocasio et al. 2002). Il apparaît intéressant au travers de *P.*

officinalis d'analyser la structure de la diversité infra-spécifique à différentes échelles spatio-temporelles et en fonction des contraintes du milieu (inondation et salinité). Le milieu insulaire présente à cet égard des caractéristiques géographiques et biologiques très spécifiques (syndrôme d'insularité). Il permet également de comprendre les effets de la fragmentation sur la structuration de la diversité génétique des espèces forestières.

La diversité des symbioses est un aspect très peu étudié sur *P. officinalis*. Bien que quelques travaux ont abordé la caractérisation des rhizobiums et des champignons mycorhiziens à arbuscules de *P. officinalis* (Bâ et al. 2002; Bâ et al. 2004), aucune étude ne s'est penchée sur la diversité génétique conjointe des partenaires de ces deux types de symbiose. D'autant que les contraintes du milieu (salinité, inondation), auxquelles les forêts marécageuses à *P. officinalis* sont soumises, pourraient affecter la distribution et la composition des symbiontes. En période d'inondation, les sols marécageux sont hypoxiques et parfois anoxiques. Ces conditions sont défavorables à une bonne dégradation de la matière organique et donc à la minéralisation de l'azote et du phosphore organique. La dénitrification et le lessivage accentuent aussi les carences en azote et en phosphore biodisponibles (Barrios & Herrera 1994). En période d'exondation, l'évapotranspiration entraîne des remontées de sel par capillarité. Dans ces contextes, *P. officinalis* développe des symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes qui pourraient interagir en synergie pour améliorer la tolérance de cette espèce aux contraintes du milieu.

Dans les Antilles en particulier en Guadeloupe, la forêt marécageuse à *P. officinalis* est actuellement en régression à cause de l'extension des infrastructures urbaines et des activités agricoles. Si on envisage de restaurer ces forêts marécageuses dégradées avec des plants de *P. officinalis* et leurs associés fongiques et bactériens, il convient de caractériser la diversité de ces microorganismes et de mieux comprendre l'établissement et le fonctionnement de ces associations symbiotiques en milieux inondé et salé.

Cependant, on peut s'interroger de l'avantage adaptatif conféré par ses symbioses au *P. officinalis* soumis à différents stress abiotiques. De même, qu'en est-il de la structuration de la diversité génétique des symbiotes et de l'évolution d'un tel système symbiotique sous l'influence des forces évolutives ?



Le cas du *Pterocarpus officinalis* Jacq., une légumineuse arborescente réalisant des symbioses mycorhiziennes et bactériennes, vivant dans les forêts marécageuses de la Caraïbe insulaire, mais aussi continentale, nous est apparu comme un sujet d'étude des plus intéressant pour tenter de nous éclairer sur ces questions.

Contexte, objectifs et présentation du travail de thèse

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet « Analyse spatiale et fonctionnelle de la diversité d'un système symbiotique en milieux insulaire et continental : cas du *Pterocarpus officinalis* Jacq. et de ses microorganismes associés en forêt marécageuse » financé par le Ministère de l'Ecologie et du Développement durable et par la Région Guadeloupe. Il est le fruit d'une collaboration entre le Laboratoire de Biologie et Physiologie végétales de l'UAG, l'unité de recherche « diversité génétique et amélioration des espèces forestières » du département Forêt du CIRAD, et le Laboratoire des Symbioses tropicales et méditerranéennes (UMR 113) de Montpellier.

Ce travail de thèse a comporté trois objectifs : 1/ réaliser une analyse comparée de la diversité génétique des populations de *P. officinalis* et des *Bradyrhizobium* associés à différentes échelles biogéographiques dans la région Caraïbe 2/ déterminer l'écologie des champignons mycorhiziens à arbuscules de *P. officinalis* le long d'un gradient de salinité en forêt marécageuse 3/ appréhender le rôle des symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes dans l'adaptation de *P. officinalis* à l'inondation.

Ce travail de thèse est présenté sous forme d'articles scientifiques en préparation, soumis ou publiés dans des revues internationales. Il comporte une synthèse bibliographique et 6 chapitres.

La synthèse bibliographique fait un état des connaissances sur la diversité génétique, la phylogéographie, l'écologie et le fonctionnement des symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes face à différents stress (salinité et inondation).

Le premier chapitre présente les sites prospectés, le plan d'échantillonnage et les marqueurs génétiques, en particulier les microsatellites nucléaires mis au point dans le cadre de cette étude. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé « Isolation and characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq. » et publié dans « Molecular Ecology Notes ».

Le second chapitre est consacré à la structuration de la diversité des populations de *P. officinalis* en milieux insulaire (Guadeloupe, Martinique, Dominique et Porto Rico) et continental (Guyane française) à l'aide des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques. Dans tous les cas, les populations insulaires apparaissent moins diversifiées que les populations du continent. Ce travail fait l'objet d'une publication intitulée « Pattern of genetic diversity of *Pterocarpus officinalis* Jacq., a tree species distributed in Caribbean zones : implication for its conservation in islands. » et soumise à la revue « Conservation Genetics ». Afin de mieux saisir les modes de dispersion de *P. officinalis*, les résultats présentés dans cette publication sont étayés à l'aide de données obtenues sur les flux de gène par graines et par pollen, ainsi que par des tests de germination après flottaison en eau douce ou en eau de mer.

Le troisième chapitre est consacré à l'analyse phylogénétique des *Bradyrhizobium* par séquençage de l'ITS. Dans cette étude, il apparaît que la diversité bactérienne au niveau insulaire est plus faible que celle de Guyane française. Ce travail est présenté sous forme d'un article intitulé « Genetic diversity patterns of *Bradyrhizobium* strains associated with *Pterocarpus officinalis* Jacq. in continental and insular Caribbean zones », en préparation. Cet article est complété par des données de diversité bactérienne obtenues par électophorèse en champ pulsé.

Le quatrième chapitre est consacré à l'écologie des champignons mycorhiziens à arbuscules le long d'un gradient de salinité en forêt marécageuse. L'absence de spores dans les sols marécageux n'a pas permis d'identifier les champignons inféodés à *P. officinalis*. Cependant, le potentiel mycorhizien des sols marécageux et le taux de mycorhization diminuent le long du gradient de salinité en saison sèche comme en saison des pluies. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé « Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient » et publié dans « Forest Ecology and Management »

Le cinquième chapitre traite du rôle des symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes dans l'adaptation de *P. officinalis* en milieu inondé. Les mycorhizes à arbuscules se révèlent efficaces sur la production de biomasse et sur l'acquisition de P dans les feuilles grâce à une colonisation mycorhizienne tout à fait remarquable en milieu inondé. Ce travail fait l'objet d'une publication intitulée « Nodulation and

arbuscular mycorrhizal colonization improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings" sous presse dans la revue « Mycorrhiza ».

Le sixième chapitre est une discussion générale et présente des perspectives à ce travail de thèse.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I) Les symbioses végétales : acteurs, origines, spécificité et reconnaissance.

1- La symbiose

En 1875, le zoologiste van Beneden (Van Benden 1975) proposa une définition permettant de distinguer la symbiose, du parasitisme «...des organismes qui se procurent l'un l'autre des services, il serait peu convenable de les appeler parasites ou commensaux. Nous trouvons plus juste de les appeler mutualistes». Le terme de symbiose a été introduit par les universitaires allemands de Bary (de Bary 1879) et Fanck (Frank 1885), à partir du grec *sun* (avec), et *bios* (vie). De Bary entendait sous le terme de symbiose «la vie en commun d'organismes d'origine systématiques distincte». A l'heure actuelle la notion de symbiose mutualiste peut se définir comme suit : « deux organismes différents coexistent durablement au cours de leur vie, à bénéfice réciproque » (Selosse 2000). Il existe une grande diversité de symbioses végétales (ex : mycorhizes, actinrhizes, bactériorhizes, lichens).

2- Exemples de symbioses végétales

Parmi les symbioses, nous pouvons citer les deux principales symbioses végétales les plus répandues dans les écosystèmes terrestres : les mycorhizes et les bactériorhizes racinaires (parfois caulaires).

Les mycorhizes sont des symbioses entre des champignons du sol et des racines de plantes. Elles comprennent les ectomycorhizes, des endomycorhizes à vésicules et à arbuscules, des endomycorhizes à pelotons et les ectoendomycorhizes. Les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules ou mycorhizes à arbuscules (MA) sont les plus répandues et concernent 90% des taxons végétaux. Elles sont présentes dans tous les milieux (terrestre, aquatique, désert) et permettent aux végétaux l'absorption d'un grand nombre de nutriments (P, N, K, Cu, Zn) grâce au volume de sol exploré qui va au-delà des poils absorbants (Smith & Read 1997). En retour, les plantes fournissent aux champignons des photosynthétats qu'ils ne peuvent produire.

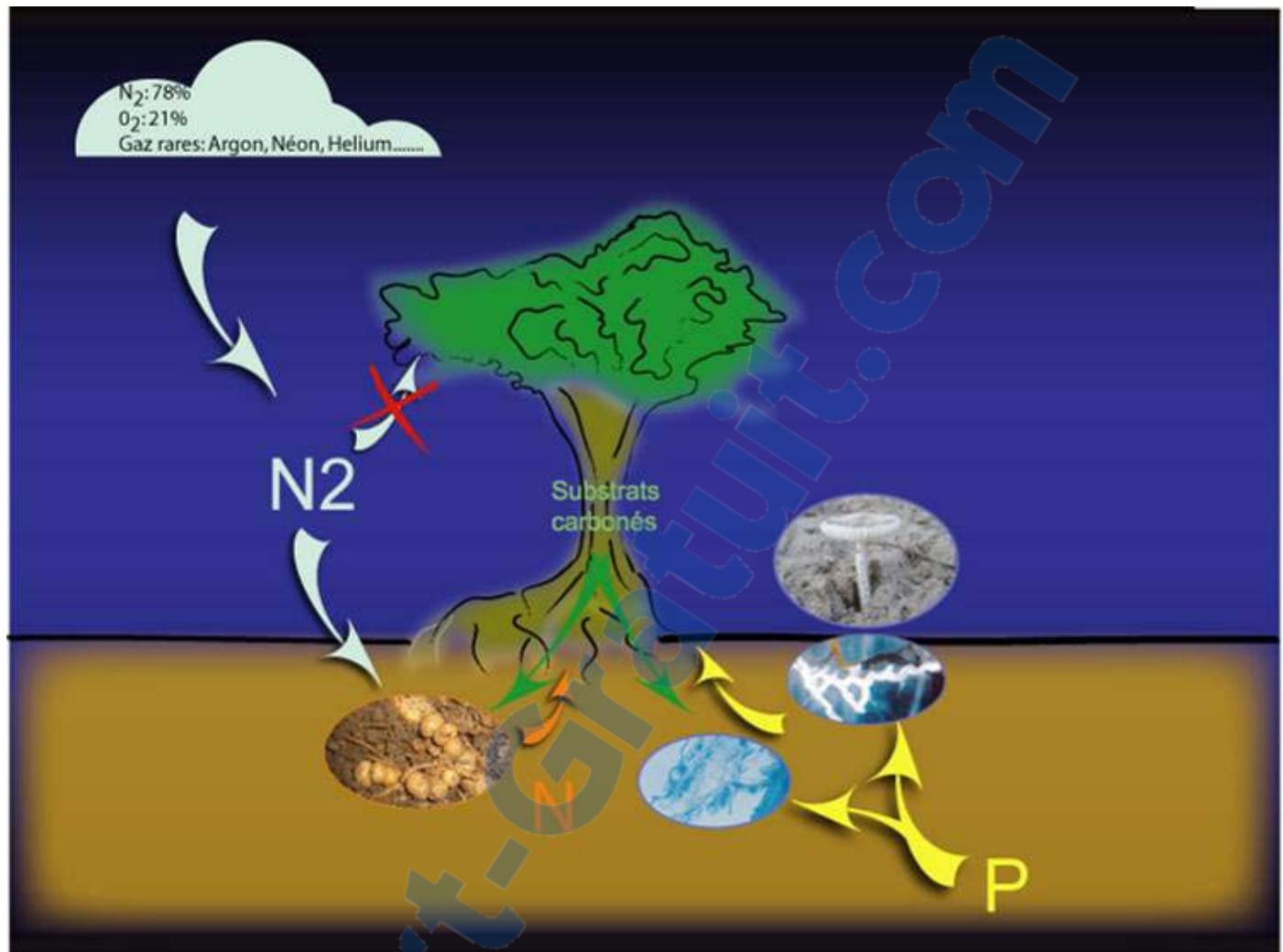


Figure 1. : Représentation schématique du fonctionnement des symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes.

Les nodosités racinaires sont le résultat d'une symbiose entre des bactéries du sol appartenant à la famille des Rhizobiacées et des racines (parfois des tiges aussi) de plantes de la famille des Légumineuses. Après les Légumineuses, les plantes actinorhiziennes (Filao, Aulne) constituent un important second groupe de plantes possédant des nodules racinaires (parfois caulinaires) fixateurs d'azote. Le symbionte est dans ce cas un actinomycète (bactérie filamenteuse) du genre *Frankia*. C'est dans les nodosités que les bactéries transforment l'azote de l'air en azote assimilable par la plante en échange de photosynthétats. Cette symbiose permet ainsi à la plante de disposer de l'azote de l'air, source inépuisable d'azote dans l'atmosphère. Cette symbiose joue un rôle important notamment dans la restauration de la fertilité des sols (Dommergues et al. 1999).

3- La symbiose mycorhizienne à arbuscules

Le terme mycorhize dérive du grec mukês (champignon) et rhiza (racine). Il a été employé pour la première fois par Frank (Frank 1885) pour définir l'organe mixte résultant de l'association entre les hyphes de champignons et les racines de végétaux. Cette association symbiotique est ubiquiste, durable et à bénéfice réciproque pour les deux partenaires, excluant ainsi toute notion de parasitisme ou de commensalisme.

3.1-Apparition et importance de la symbiose

Les MA semblent remonter à des temps très anciens. Des vestiges de MA ont été retrouvés dans les couches sédimentaires du Dévonien (-417 à -354 millions d'années) (Malloch et al. 1980). Des études phylogénétiques réalisées sur treize espèces de *Glomeromycota* (Simon et al. 1993) confirment ce résultat, en datant l'apparition de ces champignons entre le milieu de l' Ordovicien et la fin du Dévonien (-462 à -353 millions d'années), en même temps que l'apparition des plantes terrestres. Ces résultats supportent l'hypothèse d'une contribution de ces champignons à l'apparition des plantes terrestres (Davet 1996; Taylor & Osborn 1995). La grande répartition des MA, ainsi que leur ancienneté, suggèrent que toutes les mycorhizes dérivent de ce type ancestral (Brundrett 2002). Les MA auraient

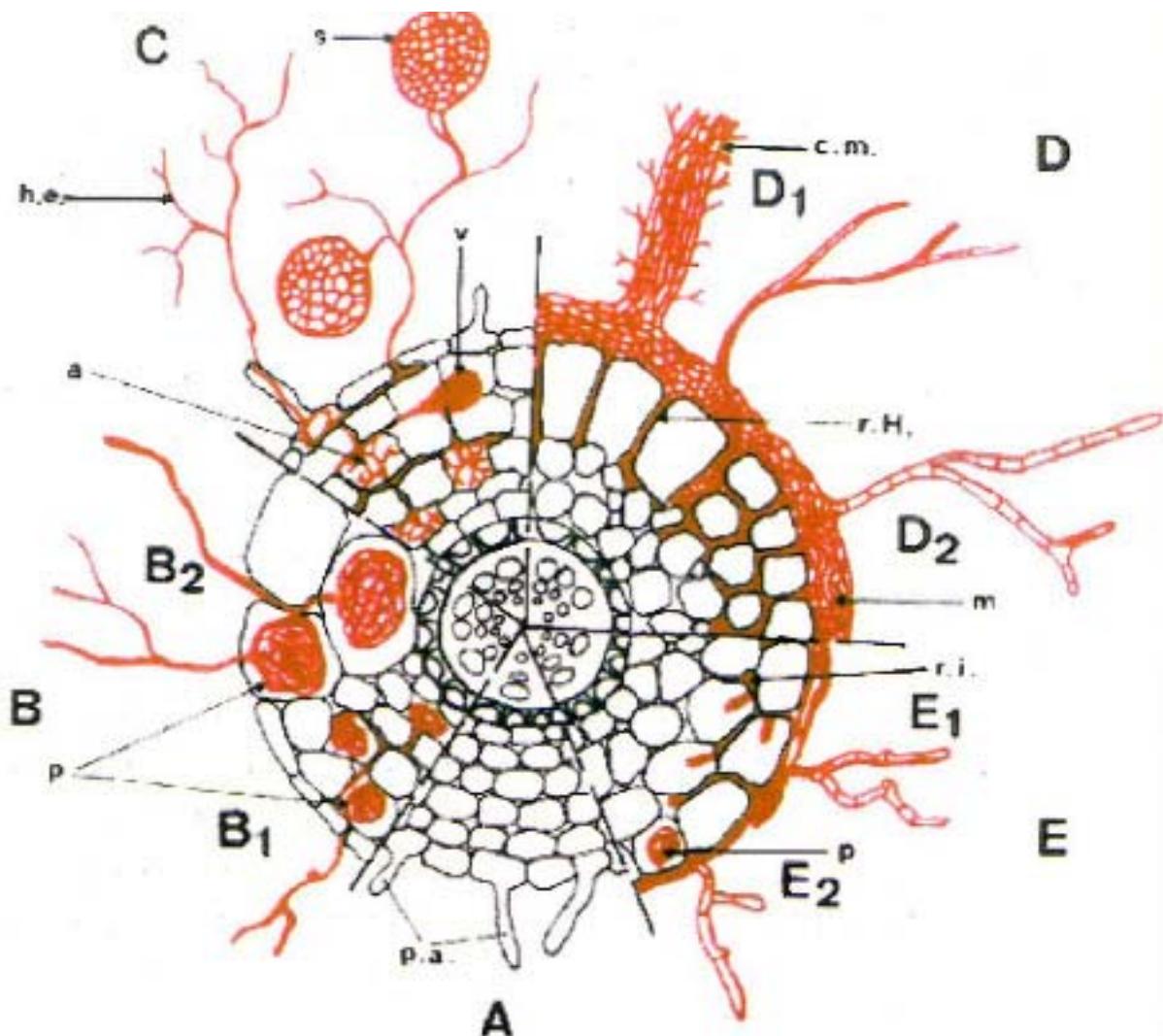


Figure 2. : Représentation schématique de la structure des mycorhizes (Mousain 1989).

A : racine non infectée et poil absorbants (pa) ; B : endomycorhizes à pelotons des Orchidacées (B1) et des Ericacées (B2) ; C endomycorhizes à vésicules et arbuscules, avec des spores (s), des hyphes externes (he), des arbuscules (a), et des vésicules (v) ; D : ectomycorhizes des angiospermes (D1) et des Gymnospermes (D2), avec des cordons mycéliens (cm), un réseau de Hartig (rh), et un manteau fongique (m) ; E : ectendomycorhizes, E1 : mycorhizes "monotropoïdes" avec un réseau mycélien intercellulaire (ri), E2 : mycorhizes "arbutoïdes" avec des pelotons d'hyphes (p).

évolué vers les ectomycorhizes *via* des associations relictuelles où coexistent ces deux grands types de mycorhizes. La mycorhization apparaît donc comme un phénomène évolutif récurrent et à travers le remplacement de champignons non septés (*Glomeromycota*) par des champignons septés (*Ascomycota* et *Basidiomycota*). Les ectomycorhizes seraient d'apparition plus récente (Crétacé). (Brundrett 2002).

Dans la nature, l'état de mycorhization est la règle et non l'exception (Gerdemann 1971). Contrairement à la symbiose fixatrice d'azote qui se cantonne à la famille des Légumineuses, à des plantes actinorhiziennes et au genre *Parasponia* de la famille des Ulmacées, les MA se trouvent dans plus de 90% des familles de plantes (Smith & Read 1997).

3.2- Les partenaires de la symbiose.

De nombreux Angiospermes mais également des Gymnospermes, des fougères, des lycopodes et des Bryophytes développent des MA (Smith & Read 1997). On trouve ces MA sur des arbres, des arbustes, des plantes agricoles, et des herbacées. On trouve très peu de MA chez les *Polygonaceae*, les *Juncaceae*, les *Chenopodiacees*, les *Brassicaceae*, et les *Caryophyllaceae*. Les champignons mycorhiziens à arbuscules sont des symbiotes obligatoires non cultivables en l'absence de plante-hôte. Ils appartiennent à la division des *Glomeromycota* (Schüssler et al. 2001). Ce sont des symbiotes biotrophes qui ne possèdent pas de stade sexué connu. Ils sont à large spectre d'hôte (Morton et al. 1995). Autrement dit, ils ne sont pas inféodés à la plante d'isolement, et peuvent donc avoir un effet bénéfique sur d'autres espèces végétales.

Les MA ne sont pas visibles à l'œil nu et se caractérisent par la présence de deux types de structures observables en microscopie optique : les arbuscules et les vésicules. Les arbuscules se trouvent exclusivement dans l'espace périplasmique des cellules corticales de la racine et présentent une structure d'hyphe très ramifiée, augmentant considérablement la surface de contact entre le champignon et la plante. Elles constituent le lieu des échanges entre les partenaires de la symbiose

(Dexheimer et al. 1985; Gianinazzi et al. 1979). Les vésicules peuvent se retrouver à l'intérieur des cellules corticales, ou s'intercaler entre celles-ci. De formes variables, elles renferment en abondance des lipides (Jabaji-Hare et al. 1984; Smith & Read 1997), qui leur confèrent une fonction d'organes de réserves, pouvant se évoluer en propagule (Biermann & Linderman 1983; Bonfante-Fasolo 1984).

Les champignons intervenant dans ce type d'association, appartiennent à trois familles : *Gigasporineae*, *Glomaceae* et *Acaulosporaceae*. Deux cents espèces environ se répartissent majoritairement au sein de cinq genres (*Glomus*, *Gigaspora*, *Entrophospora*, *Scutellospora*, *Acaulospora*). Ces espèces sont reconnaissables à leurs spores, différenciables par des caractères morphologiques et structuraux, ou par l'analyse moléculaire.

Les MA améliorent la nutrition minérale des plantes (particulièrement le P et le K (Smith & Read 1997). En retour, la plante fournit aux champignons hétérotrophes (pour le C) des sucres issus de l'assimilation chlorophyllienne. On estime que le champignon utilise entre 4 et 20% des sucres produits par la plante (Douds & Pfeffer 2000; Graham 2000)

4- Les symbioses rhizobiums-Légumineuses

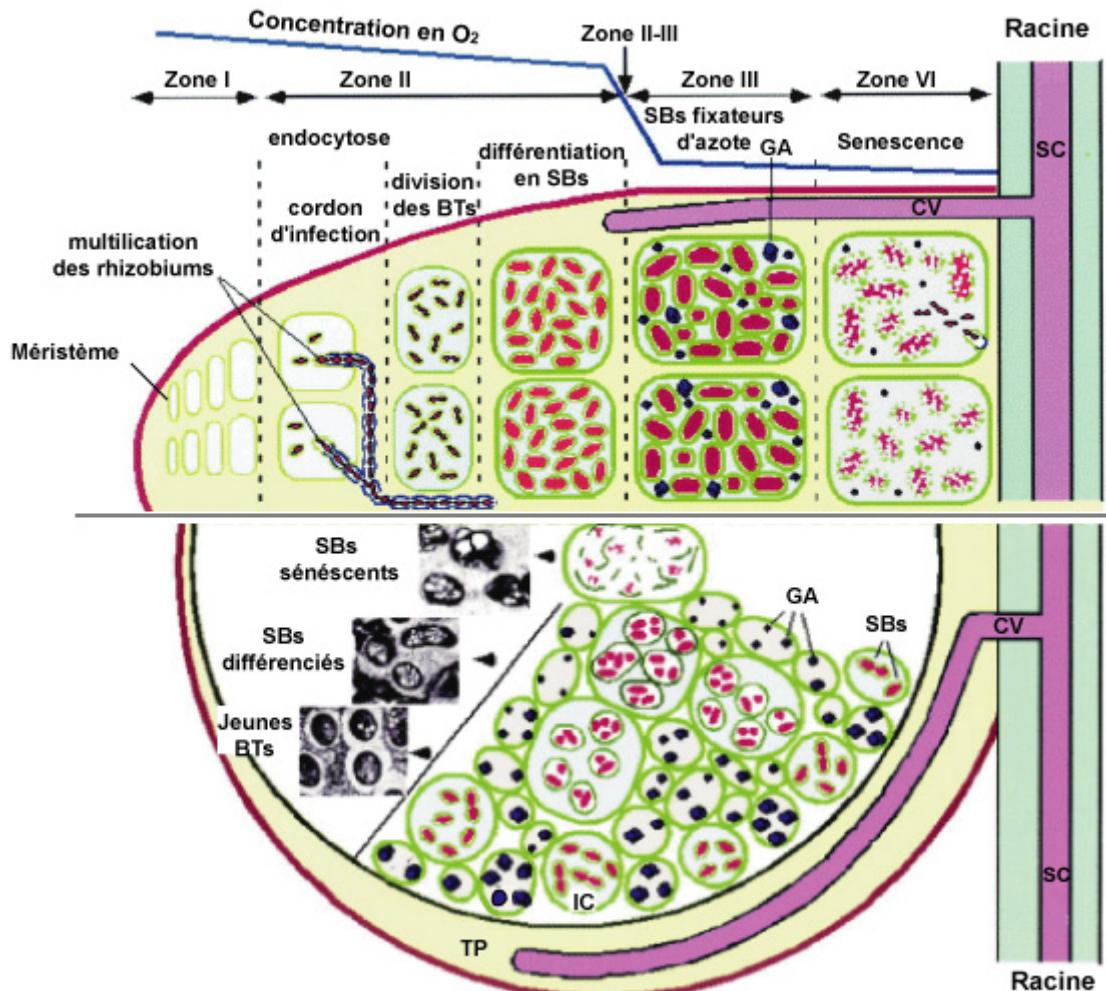
L'azote est indispensable à la croissance des plantes. Bien que l'azote moléculaire soit l'élément le plus abondant de l'atmosphère, les plantes sont incapables de l'utiliser sous cette forme. Pour être assimilable par les végétaux, l'azote se doit d'être sous forme réduite ou oxydé. Cette étape est réalisée lors de la fixation de l'azote par les organismes procaryotes vivant en symbiose ou non, avec une production estimée entre 100 et 150 millions de tonnes métriques annuelles (Burns & Hardy 1975).

La symbiose rhizobium-Légumineuse est à elle seule responsable de près du tiers de la fixation biologique de l'azote au niveau mondial. Les enjeux économiques, sociaux, mais aussi écologiques font de cette symbiose l'une des plus étudiées, et des mieux connues à l'heure actuelle (Dommergues et al. 1999).

Lorsque l'azote combiné présent dans le milieu, ne peut satisfaire les besoins de la légumineuse hôte, les rhizobia induisent la formation de nodules généralement racinaires, mais parfois aussi caulinaires (ex :*Sesbania rostrata*). Les nodules sont des organes d'échanges vascularisés, dans lesquels les bactéries se différencient en bactéroïdes. Les bactéroïdes se caractérisent par une membrane supplémentaire à leur propre enveloppe, appelée membrane péribactéroïde, ou membrane de séquestration qui dérive de la membrane cytoplasmique de la plante-hôte. Une nouvelle unité fonctionnelle est réalisée, le symbosome, qui comprend le bactéroïde, l'espace péribactéroïdien et la membrane péribactéroïde. Il existe deux types de nodules, les nodules dits indéterminés et les nodules déterminés. Les nodules indéterminés se distinguent des nodules déterminés de forme ronde par un méristème persistant, responsable de leur forme allongée (Figure 3) (Patriarca et al. 2002).

Au sein de ces nodules, la conversion de l'azote moléculaire en ammonium, une forme azotée assimilable par les végétaux, est effectuée par la nitrogénase, un complexe enzymatique bactérien formé par deux métalloprotéines. Cependant, la nitrogénase est sensible à la présence d'oxygène libre ou à des pressions partielles d'oxygène trop importantes. Afin de garantir les besoins métaboliques des bactéroïdes en oxygène, tout en préservant l'activité de la nitrogénase, les plantes hôtes synthétisent une protéine appelée leghémoglobine. La leghémoglobine joue un rôle capital dans le fonctionnement de la nodosité en régulant l'oxygène au sein du nodule. C'est l'une des principales protéines solubles retrouvées dans le cytosol du nodule, pouvant représenter jusqu'à 40% des protéines solubles totales d'une nodosité mature. (Nash & Schulman 1976).

Nodule indéterminé



Nodule déterminé

Figure 3. : Modes de différenciation des nodules.

Comparaison d'un nodule indéterminé (haut) et d'un nodule déterminé (bas). SC : stèle centrale ; CV : cordon vasculaire ; BTs : bactéroïdes ; SBs : symbiosomes ; TP : tissu périphérique ; IC : cellules infectées ; NC : cellules non infectées ; GA : grain d'amidon. Adapté d'après (Patriarca et al. 2002)

4.1- Apparition et évolution de la fixation d'azote

Deux modèles évolutifs ont cours, et se basent sur la composition de l'atmosphère primitive, soit neutre, soit fortement réductrice, mais tenant systématique compte de l'absence d'oxygène néfaste à la nitrogénase (Fani et al. 2000) :

La première hypothèse suggère que l'atmosphère primitive était neutre et contenait de l'azote moléculaire en abondance, mais pas d'ammonium. L'apparition de l'enzyme nitrogénase aurait été alors un évènement indispensable à la survie des premières cellules pour la synthèse de leurs macromolécules. Le système nitrogénase aurait été conservé par la pression de sélection exercée par le stress azoté (Fani et al. 2000).

La deuxième hypothèse suggère que l'atmosphère primitive était fortement réductrice. Ce second modèle plus couramment accepté est basé sur la faible spécificité de la nitrogénase pour l'azote moléculaire et sa capacité à interagir avec d'autres composés à triple liaison tels que les cyanides d'hydrogène, les oxydes nitreux, les azides d'hydrogène ou encore l'acétylène (voir chapitre 5). La nitrogénase aurait donc eu tout d'abord un rôle de détoxification avant de fixer un autre composé à triples liaisons qu'est le dihydrogène. Ce rôle de la nitrogénase aurait été conservé par certaines bactéries et archéobactéries vivant dans des milieux pauvres en ressources azotées (Fani et al. 2000).

4.2- Origine de la symbiose.

Il existe de fortes homologies entre les rhizobiums et les bactéries pathogènes de plantes. C'est le cas des *Sinorhizobium* génétiquement et phénotypiquement proches des *Agrobacterium*. Les plantes présentent des réactions similaires face au développement de nodules, ou lors de l'infection par des pathogènes (synthèse de flavonoïdes, d'inhibiteurs de protéase et de chitinase) (Provorov 1998). Certains rhizobiums présentent des stratégies de type pathogène afin d'induire la synthèse de métabolites. Ces fortes homologies suggéreraient que les rhizobiums seraient

apparus à partir de pathogènes de végétaux. Cependant, aucune homologie n'existe entre les gènes impliqués dans la nodulation et les gènes de virulence des pathogènes. C'est pourquoi, il semble plus probable que ces homologies soient le fruit de recombinaisons inter-génomiques et de transferts horizontaux entre bactéries de genres différents.

Selon Provorov (1998), deux hypothèses fondées sur le bénéfice réciproque des interactions entre plantes et bactéries pourraient expliquer l'apparition de la symbiose. La première suppose les origines de la symbiose dans une association occasionnelle entre des bactéries fixatrices d'azote à l'état libre et la surface des racines de la plante. De cette symbiose instable aurait découlé, l'invasion bactérienne au niveau du cortex racinaire, puis une spécialisation de certains tissus de la plante. La seconde hypothèse repose toujours sur l'interaction de bactéries fixatrices d'azote à l'état libre, mais cette fois-ci avec des structures végétales particulières de type pseudonodule au niveau de leurs racines. Ces pseudonodules auraient pu être des organes voués au stockage de matière carbonée, les prédisposant ainsi à l'acheminement des métabolites nécessaires à l'endosymbiose. Ces deux hypothèses restent très proches, puisque dans les deux cas, les prémisses de la nodulation se sont établies par le contact entre bactéries libres et les racines de l'hôte (Provorov 1998).

4.3- Les rhizobiums.

Le terme de rhizobium provient du grec Riza (racine) et Bios (vie). Les rhizobiums appartiennent à la famille des Rhizobiacées. Ce sont des bactéries en forme de bâtonnet, gram-négatives, aérobies et non sporulantes. Elles peuvent survivre et se reproduire dans le sol. Elles ne fixent pas l'azote atmosphérique à l'état libre (sauf *Azorhizobium*). Elles sont généralement plus connues pour leur capacité à induire la formation de nodosités racinaires, et plus rarement caulinaires, chez les plantes hôtes. Une seule bactérie est capable de produire des milliards de descendants au sein d'un nodule. Les rhizobiums sont polyphylétiques et ne représentent pas une entité taxonomique ou phylogénique. Ils se répartissent à l'heure actuelle dans 12 genres et une cinquantaine d'espèces principalement parmi les alpha-

Protéobactéries, mais aussi plus rarement chez les bêta-Protéobactéries (Chen et al. 2001; Moulin et al. 2001). Ils sont phylogénétiquement intercalés parmi de nombreux autres genres et espèces de bactéries non-symbiotiques dont des pathogènes. Initialement, les rhizobiums étaient caractérisés par leur vitesse de-croissance. Le genre *Rhizobium* caractérisé par une croissance rapide, a été subdivisé en plusieurs genres : *Rhizobium*, *Ensifer* (anciennement nommé *Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*. Le genre *Bradyrhizobium* se différenciait quant à lui par ses souches à croissance lente. Les différentes lignées de rhizobiums auraient divergé bien avant l'apparition des légumineuses, avec une scission, entre les bactéries à croissance rapide et à croissance lente, estimée à environ 500 millions d'années. La capacité à noduler des bactéries symbiotiques pourrait être apparue au sein d'une seule lignée bactérienne, puis être transmise par l'intermédiaire de transferts latéraux de gènes entre les différentes lignées et espèces nodulantes (Moulin et al. 2004).

La classification des rhizobiums est en remaniement constant, ce, principalement du fait de l'utilisation des séquences de l'ADNr 16S, et plus récemment grâce à l'étude des gènes impliqués dans la nodulation (*nodA*, *nodZ*, *noeE*, *noeI*), ou d'entretien cellulaire (*recA*, *glnII*, *dnaK*, *atpD*).

Les *Rhizobium* : groupe connu le plus ancien, contenant un grand nombre d'espèces, il a été décrit par Frank (Frank 1889). On a très longtemps classé tous les rhizobiums dans ce groupe. Les *Rhizobium* présentent de fortes similitudes génétiques avec des bactéries du genre *Agrobacterium*.

Les *Mesorhizobium* : Ce groupe a été décrit par (Jarvis et al. 1997). On y retrouve de nombreuses souches initialement classées dans le groupe des *Rhizobium*.

Les *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*) : Le genre *Sinorhizobium* a été décrit par (Chen et al. 2001), mais s'est avéré être un synonyme du genre *Ensifer* antérieurement décrit par Casida (1982) (Young 2003).

Les *Bradyrhizobium* : Le genre *Bradyrhizobium*, à croissance lente, a été décrit par Jordan (1982). Ce genre contient une diversité considérable de souches différentes, vivant en symbiose avec un très grand nombre de légumineuses, aussi bien herbacées, qu'arborescentes, d'origine tropicale, comme tempérée (Vinuesa et al. 2005). Elles sont aussi associées à des légumineuses aquatiques tel que les *Aeschynomene*, mais aussi chez des non-légumineuses comme c'est le cas chez *Parasponia andersonii* (Sprent 2001). Ce sont aussi des bactéries endophytes de différentes variétés de riz (Chaintreuil et al. 2000; Tan et al.) On y retrouve *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* capables de noduler le soja (*Glycine max*), ainsi que *B. yuanmingense* chez la légumineuse hôte *Lespedeza*. Les *Bradyrhizobium* isolés à partir d'autres espèces de légumineuses portent le nom de *Bradyrhizobium* sp. (sp se traduit par espèce génomique), suivi du nom de la plante hôte entre parenthèses. Les *Bradyrhizobium* présentent de fortes similitudes phylogéniques avec les espèces du genre *Afipia*, *Blastobacter denitrificans*, *Nitrobacter*, et *Rhodopseudomonas palustris*.

Les *Azorhizobium* : Ce genre ne contient qu'un seul membre à l'heure actuelle. Les isolats proviennent de nodules de tige de *Sesbania rostrata*, une légumineuse tropicale (Dreyfus et al. 1988). Ce genre bactérien se caractérise des autres Rhizobiacées par sa capacité à réaliser de la fixation azotée à l'état libre sous faible pression partielle d'oxygène.

Les *Methylobacterium* : Ce genre, ne contient qu'un seul membre *Methylobacterium nodulans*, isolé à partir de *Crotalaria* spp (Jordan 1982; Sy et al. 2001) ayant l'originale particularité de croître facultativement sur du méthanol comme unique source carbonée. Ce genre pourrait bientôt voir l'arrivée d'une nouvelle espèce *Methylobacterium adhaesivum* sp (Gallego et al. 2006).

Les *Burkholderia* : Bon nombre des représentants de ce genre ont fait partie du genre *Pseudomonas*. Les espèces du genre *Burkholderia* ont pour principal habitat le sol et les plantes, cependant, quelques espèces sont pathogènes pour l'homme ou l'animal, ou se comportent comme des

pathogènes opportunistes. *Burkholderia tuberum* et *Burkholderia phymatum* ont été les deux premières souches appartenant aux Burkholderia isolées respectivement à partir de nodules de *Aspalathus* et *Machaerium* (Vandamme et al. 2002).

Les *Ralstonia* : Elles sont connues aussi sous les noms de genre *Wautersia*, et de *Cupriavidus*. Elles ne contiennent qu'un seul représentant pour le moment, *Ralstonia taiwanensis* isolé à partir de nodules *Misosa* poussant sur le sol taïwanais (Chen et al. 2003).

Les *Devosia* : Elles ont été isolées à partir de nodules de *Neptunia natans*, une légumineuse aquatique originaire de l'Afrique tropicale et subtropicale (Rivas et al. 2002).

Les *Ochrobactrum* : Une seule espèce du genre *Ochrobactrum lupini*; a été isolée à partir de nodules de *Lupinus honoratus* (Trujillo et al. 2005)

Les *Phyllobacterium* : Un unique membre *Phyllobacterium trifolii* a été isolé à partir de nodules de *Trifolium pratense* (Valverde et al. 2005).

4.4- Taxonomie polyphasique dans le genre *Bradyrhizobium*

La taxonomie s'intéresse aux relations pouvant exister entre les organismes. Elle permet d'aboutir à une classification, indispensable à l'identification de tout organisme. La taxonomie regroupe trois types d'approches, la classification ou l'arrangement des organismes dans des groupes sur la base de similarités, la nomenclature permettant de nommer les groupes trouvés, et l'identification d'organismes inconnus.

La taxonomie polyphasique est un consensus entre différentes méthodes de typage. A l'heure actuelle, pour qu'une espèce soit validée par le comité de taxonomie des Rhizobiacées, il faut qu'elle remplisse un certain nombre de conditions, aussi bien au

niveau de la cohérence phénotypique, que par un degré significatif d'homologie ADN/ADN de 70% ou plus, ainsi qu'une homologie des séquences ADNr 16S d'au moins 97% (Vandamme et al. 1996).

Chez les *Bradyrhizobium*s la taxonomie du genre est loin d'être résolue, et reste encore à un stade préliminaire. La taxonomie polyphasique s'est heurtée à l'absence de consensus entre les différentes données phénologiques, et phylogéniques (Vinuesa et al. 2005). L'homogénéité même du genre *Bradyrhizobium* est en cause. Les *Bradyrhizobium* forment un groupe polyphylétique ; *B. japonicum* est phylogénétiquement séparée de *B. elkanii* et de divers *Bradyrhizobium*s sp. par d'autres espèces bactériennes. Ces espèces présentent de fortes similitudes génétiques avec le genre *Bradyrhizobium*s, c'est le cas d'*Afipia*, d'*Agromonas*, de *Blastobacter*, de *Nitrobacter*, et de *Rhodopseudomonas*. L'espèce *B. japonicum* elle-même présente deux groupes distincts d'hybridation ADN/ADN.

4.5-Les Légumineuses

Les Légumineuses (Fabacées) constituent une des familles de plantes à graines les plus répandues sur la planète, et l'une des plus cultivées. En 2004, elles représentaient 13% des terres cultivées.

(<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset5agriculture>).

Les Légumineuses sont des Dicotylédones qui seraient apparues à la fin du crétacé, il y a 65 millions d'années. Cette famille, forte d'environ 20000 espèces réparties en 727 genres (Lewis et al. 2005), est la troisième plus grande famille de plante à fleurs. Elle se divise en 3 grandes sous-familles que sont les *Caesalpinoideae*, les *Mimosoideae* et les *Faboideae*, ainsi qu'une petite sous-famille les *Cercideae*. Les légumineuses se répartissent de façon inégale au sein de ces familles, tant par leur nombre, que par la proportion d'entre elles aptes à réaliser des symbioses fixatrices d'azote. La distinction des sous-familles se réalise à partir de la forme des fleurs, mais aussi en fonction d'autres caractéristiques chimiques, morphologiques, ou génétiques (Stevens 2001).

La capacité à réaliser des symbioses fixatrices d'azote correspond à une véritable particularité génétique que possèdent les légumineuses dans le règne végétal (Young & Johnson 1989). Seule une espèce appartenant au genre *Parasponia* (*Ulmaceae*) n'appartenant pas à cette grande famille partage cette capacité à la nodulation.

Les *Faboideae* (Papilionacées) sont reconnaissables par leurs fleurs en forme de papillon. C'est la plus grande sous-famille de légumineuse avec près de 14000 espèces réparties en près de 500 genres. On y retrouve des herbes, des lianes, ainsi que des arbres et arbustes en provenance des régions tempérées et tropicales. Sur 21% d'espèces étudiées, 97% sont capables de réaliser des symbioses (de Faria et al. 1989). Cette sous-famille regroupe un grand nombre d'espèces d'intérêt agronomique tel que *Glycine max* (Soja), *Pisum sativum* (pois), *Cicer arietinum* (pois chiche), *Phaseolus vulgaris* (haricot), *Lens culinaris* (lentille) et *Arachis hypogaea* (arachide), mais aussi *Pterocarpus officinalis* Jacq.

Les *Caesalpinioideae* se caractérisent par leurs fleurs zygomorphes à 5 pétales. Cette sous-famille est composée majoritairement d'arbres et d'arbustes tropicaux et subtropicaux parfois reconnus pour leurs qualités ornementales, comme *Delonix regia* (le flamboyant). Sur environ 2300 espèces appartenant à près de 150 genres, un quart des espèces étudiées, sont aptes à réaliser des symbioses (de Faria et al. 1989).

Les *Mimosoideae* se distinguent par leurs petites fleurs actinomorphes ressemblant à des pompons. Comme les Césalpiniacées cette sous-famille est composée majoritairement d'arbres et d'arbustes tropicaux et subtropicaux. Cette sous-famille se compose de 3300 espèces, réparties en un peu moins de 100 genres, dont près de 90% sont capables de noduler sur les 10% d'espèces étudiées (de Faria et al. 1989). Les deux genres les plus connus sont les *Acacia* et les *Mimosa*, ces deux genres englobent bon nombre d'espèces d'intérêts économiques tel qu'*Acacia melanoxylon* pour son bois, ou l'*Acacia senegal* dont on tire la gomme arabique.

Cf : Figure 4 arbre simplifié de la famille des Légumineuses (Gepts et al. 2005)

5- Établissement de la symbiose rhizobium-Légumineuses

5.1-La spécificité de la symbiose

Pour qu'une relation spécifique s'établisse entre un rhizobium et une Légumineuse, une compatibilité entre l'hôte et la bactérie est nécessaire. Les légumineuses, tout comme leurs bactéries associées ne sont capables de réaliser des symbioses qu'avec un faible nombre de partenaires symbiotiques. On parlera alors de spectre d'hôtes, pouvant être de très spécifique à large. La bactérie *Azorhizobium caulinodans* ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al. 1988), alors que la souche *Ensifer* sp. NGR234 est capable de noduler 120 genres (Pueppke & Broughton 1999). Cependant la plupart des rhizobiums sont capables de s'associer avec différents partenaires végétaux (Zahran 2001). Le pois afghan nécessite des souches bactériennes très spécifiques pour l'établissement de la symbiose (Ovtyna et al. 1998), alors que des espèces telles que *Macroptilium atropurpureum* sont connues et exploitées pour leur très large spectre d'hôtes.

5.2-L'établissement de la symbiose

5.2.1-L'intérêt des protagonistes à l'établissement de la symbiose

L'intérêt de la symbiose rhizobium Légumineuses semble relativement clair pour la Légumineuse afin de répondre à ses besoins métaboliques en dérivés azotés (McKey 1994). Du côté des bactéries, le bénéfice se situe à l'intérieur du nodule et/ou au niveau de sa survie, une fois libéré dans la rhizosphère. En procurant l'azote nécessaire à la plante, les bactéries améliorent la photosynthèse de cette dernière, facilitant ainsi leur accès aux photosynthétats. Cette source carbonée permet la production de molécules de stockage riches en énergie, telles que les

polyhydroxybutyrate, leur donnant ainsi un avantage certain une fois relâchées, et remises en compétition avec les autres bactéries du sol (Denison & Kiers 2004).

Généralement un nodule contient près de 15×10^9 bactéroïdes/gr/poid sec dont environ 60% viables La sénescence du nodule se caractérise par une augmentation de l'activité protéolytique. Les bactéroïdes ne semblent pas détruits au cours de la sénescence et restent en mesure de se redifférencier. Ainsi près de 50% des bactéroïdes contenus dans le nodule, pourraient potentiellement être relargués dans le milieu extérieur, leur conférant ainsi un avantage sélectif par rapport aux bactéries du milieu extérieur (Müller et al. 2001a; Müller et al. 2001b).

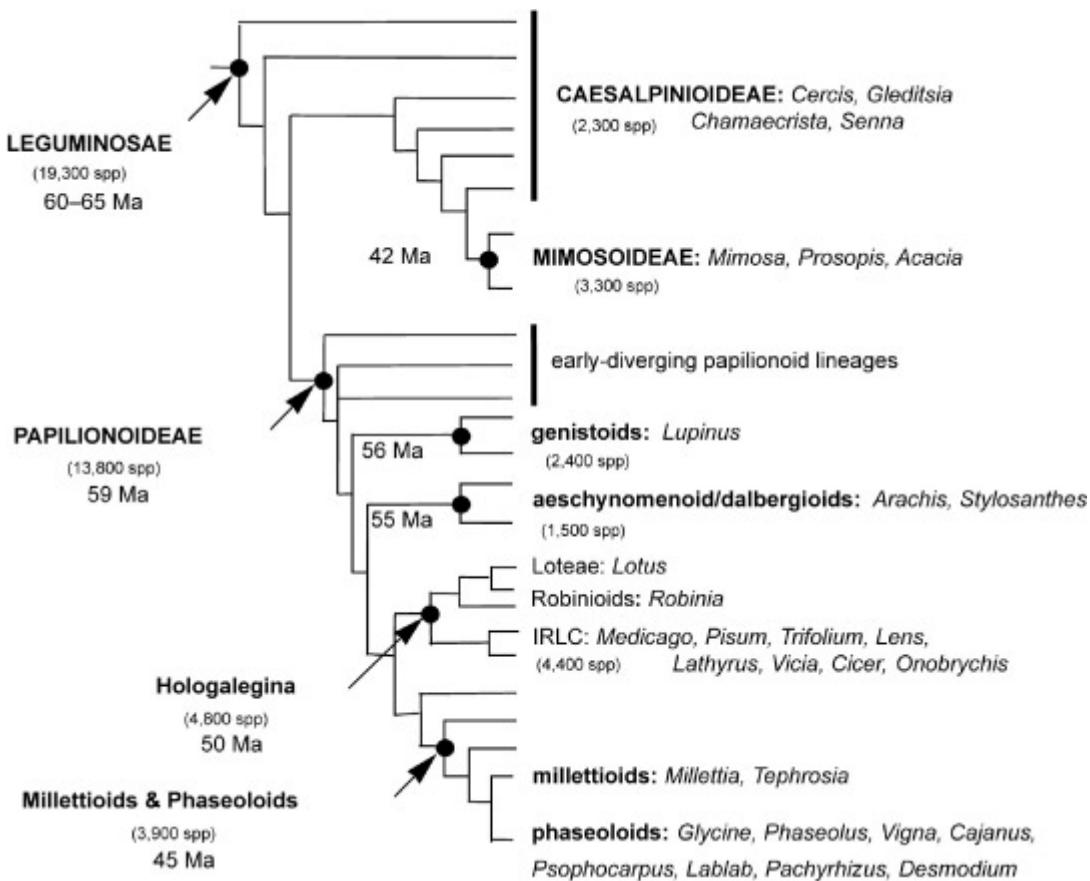


Figure 4. : Arbre simplifié de la famille des Légumineuses (modifié à partir de Doyle and Luckow, 2003). Les trois sous familles (Caesalpinoideae, Mimosoideae, and Papilioideae) et les sous embranchements majeurs identifiés par des études phylogéniques récentes sont en gras (Kajita et al., 2001; Wojciechowski et al., 2004), les positions indiquées par un cercle noir présentent une estimation du nombre de taxons d'après Lewis et al., 2005, et l'âge en million d'années d'après Lavin et al., 2005. Arbre issu de (Gepts et al. 2005)

5.2.2-La reconnaissance plante-bactérie

L'établissement de la symbiose suppose une étape de reconnaissance qui implique un échange de signaux entre les deux partenaires (Denarie & Cullimore 1993; Kistner & Parniske 2002). Ce dialogue moléculaire entre les deux protagonistes, peut être plus ou moins spécifique selon les espèces. Ce processus de reconnaissance est une étape primordiale à l'établissement de la symbiose :

- Signaux émis par la plante

Les exsudats racinaires de Légumineuses renferment une diversité de composés (acides aminés, sucres, flavonoïdes, bétaïnes) qui attirent les rhizobiums par chimiotactisme. Des substances inductrices provenant des racines (flavonoïdes, bétaïnes) peuvent induire l'expression de gènes de nodulation chez certains rhizobiums de la rhizosphère. La sécrétion de flavonoïdes n'est pas l'apanage des Légumineuses ; de nombreuses plantes vasculaires sont à même de produire ce type d'exsudat reconnu par les rhizobiums. Il est donc primordial que les rhizobiums soient à leur tour reconnus par la plante-hôte

- Signaux émis par la bactérie

Chaque plante-hôte synthétise un spectre différent de flavonoïdes, reconnu spécifiquement par un certain nombre de bactéries *via* l'activation de gènes *nodD*. Ce mécanisme compose le premier niveau de spécificité plante hôte-bactérie reposant sur la sélectivité des protéines régulatrices de la bactérie pour les flavonoïdes. Ce rôle de sélection est assuré par les protéines NodD, des régulateurs transcriptionnels à motifs LysR. Le changement de conformation des protéines NodD, lors de l'interaction avec les flavonoïdes, leur permet de se lier aux parties promotrices conservées que sont les loci *nod* (*nodbox*) des gènes *nod*, indépendamment de la présence de flavonoïdes. Ces gènes *nod* codent pour la synthèse de facteurs Nod nécessaires à la formation des nodosités. Le nombre de copies, ainsi que l'affinité des protéines NodD pour les flavonoïdes varient en fonction des souches bactériennes. Ainsi *Sinorhizobium melioti*, possède 3 copies de *nodD* dont les produits protéiques ne reconnaissent que peu de flavonoïdes, lui

conférant par là même un spectre d'hôte restreint. Parallèlement, la souche *Sinorhizobium* sp. NGR234 qui exhibe deux copies *nodD* dont les protéines dérivées sont aptes à reconnaître un grand nombre de flavonoïdes, présente un large spectre d'hôte (Broughton & Perret 1999). On note aussi la présence d'inhibiteurs chez les rhizobiums, capables de se fixer, et de réprimer l'expression des gènes *nod*. Certains facteurs environnementaux, tel le pH, la concentration en calcium, ou en azote combiné vont influencer l'expression des gènes *nod*.

Il existe un grand nombre de gène *nod*, codant pour un grand nombre de facteur Nod. On peut distinguer deux grands groupes de gènes *nod*. Le premier contenant les gènes *nod* dit commun (structure et fonction commune), à savoir *nodA*, *nodB*, et *nodC*, présents en copie unique, responsable de la biosynthèse d'un facteur Nod « minimal », communs à toutes les souches de rhizobiums, alors que le gène *nodD* code pour une protéine à domaine *LysR* intervenant dans la transcription et la régulation des autres gènes de nodulation en réponse aux flavonoïdes excrétés par la plante. Dans le second groupe, on trouvera des gènes *nol* ou *noe* impliqués dans la spécificité d'hôte, intervenant principalement au niveau de la synthèse (type de substitution ajouté) ou de la sécrétion des facteurs de nodulation (Moulin 2002)

La réponse de la plante aux facteurs Nod

Les facteurs Nod constituent un deuxième niveau de reconnaissance de la symbiose. En effet, les Légumineuses se distinguent des autres plantes par leur réactivité en présence de faible concentration de facteurs Nod sécrétés par leurs symbiotes bactériens. Ces facteurs Nod vont induire spécifiquement l'initiation du méristème nodulaire, la courbure du poil abordant, la formation du cordon d'infection et la néosynthèse de flavonoïdes. Le primordium nodulaire en formation au niveau du cortex, sera atteint par un cordon d'infection permettant aux bactéries d'être acheminées dans les cellules végétales par un processus d'endocytose. Le primordium nodulaire se développe en nodule, pendant que les bactéries vont se différencier en bactéroïdes, isolées du cytoplasme végétal par une membrane péribactéroïde (Perret et al. 2000) (Figure 5).

Même si la combinaison flavonoïdes/ protéines NodD/facteurs Nod permet d'expliquer la spécificité d'hôte, la mise en place de la symbiose dans son intégralité, nécessite l'intervention d'autres constituants aussi bien chez la plante, que chez la bactérie. Il est par exemple nécessaire pour la bactérie de neutraliser le système de défense de l'hôte. De même, l'initiation et l'élongation du cordon d'infection réclament des constituants spécifiques de la membrane cellulaire bactérienne (Broughton & Perret 1999).

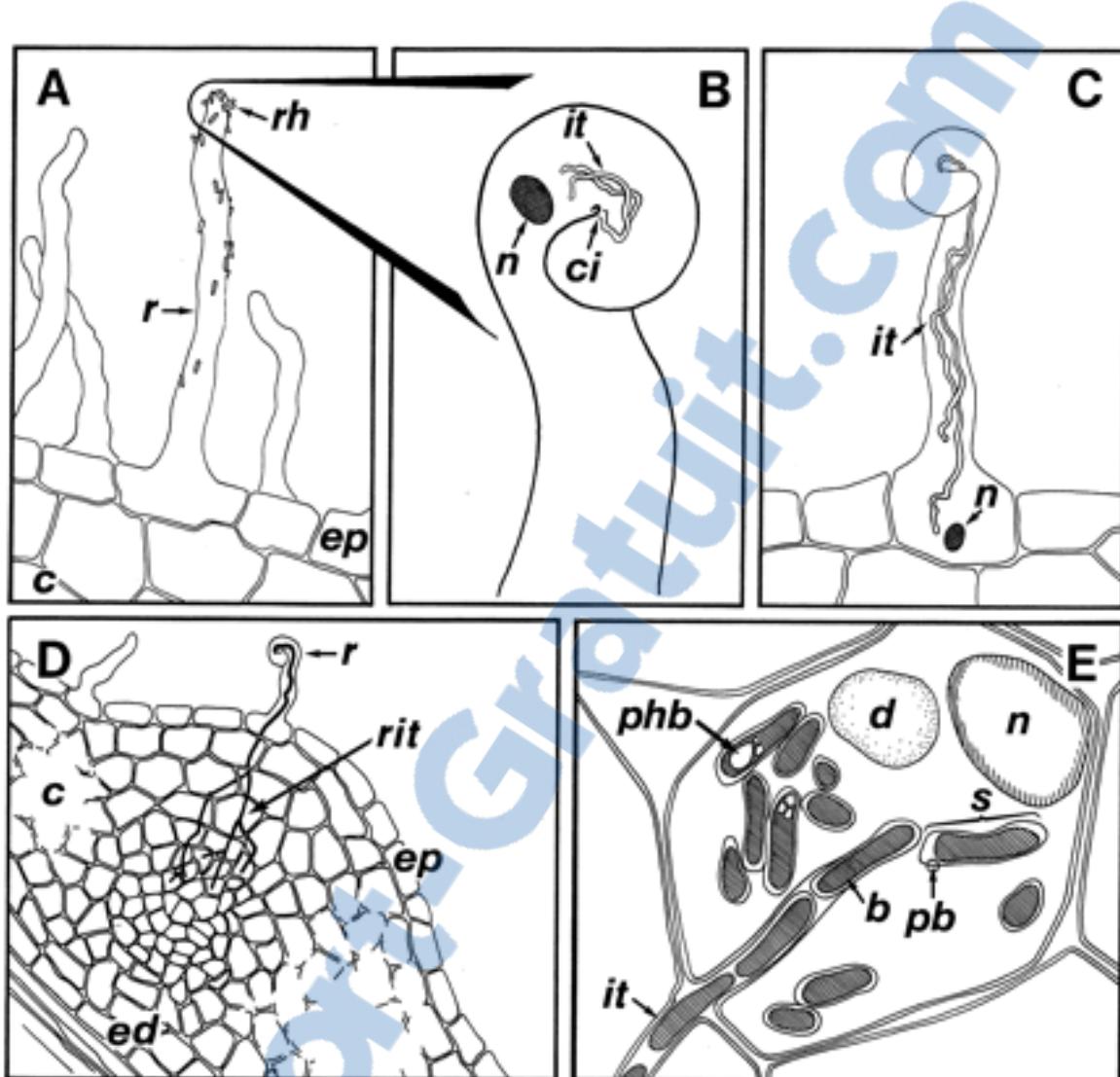


Figure 5. : Invasion des poils racinaires et infection par un rhizobium. (Perret et al. 2000)

A : Les rhizobium (rh) colonisent la rhizosphère et s'attachent aux poils racinaires (r). B : Les facteurs Nod induisent la courbure du poil racinaire et permettent ainsi la pénétration des bactéries au niveau du centre d'infection (ci). Le noyau de la cellule végétale (n) précède l'avancée du cordon d'infection (it). C : Toujours accompagné du noyau (n), un cordon d'infection (it) atteint la base de la cellule du poil racinaire. D : Le cordon d'infection se ramifie (rit) à proximité du primordium nodulaire formé par les cellules corticales en division. E : Les bactéroïdes (b) sont relargués depuis le cordon d'infection et forment des symbiosomes (s) dans les cellules du nodule. Des granules de poly-β-hydroxybutarate (phb) s'accumulent dans les bactéroïdes entourés de la membrane péribactéroïdienne (pb). Autres abréviations c : cortex ; d : vacuole digestive ; ep : épiderme ; ed : endoderme.

II) Adaptation des plantes et de leurs symbiotes à l'inondation et à la salinité

Dans leur habitat naturel, les plantes et leurs microorganismes associés sont soumis à des stress abiotiques : sécheresse, inondation, salinité, pollution, températures extrêmes. Les réponses physiologiques des plantes à ces différents stress ont des caractéristiques similaires. Ces stress provoquent en général une augmentation de la concentration en acide abcessique (ABA) dans la partie aérienne (Munns 2005). Ceci conduit à la fermeture des stomates et donc à une diminution de la transpiration et de la croissance. La réduction de la croissance est une stratégie adaptative nécessaire à la survie des plantes exposées à un stress abiotique (Zhu 2001). En effet, la plante va consacrer l'essentiel de ses ressources énergétiques dans les stratégies d'adaptation aux dépens de la croissance. Elle évite ainsi les dommages occasionnés par le stress et rétablit l'équilibre homéostatique dans le nouvel environnement stressant (Munns 2005). Une corrélation inverse est d'ailleurs souvent observée entre la croissance et la résistance des plantes à divers stress abiotiques (Zhu 2001).

1- Tolérance des symbioses végétales à la salinité

1.1- Tolérance des plantes à la salinité

Près de 40% des terres émergées, principalement dans les régions méditerranéennes et tropicales, sont affectées par la salinité (Zahran 1999). En présence de sel, les plantes sont confrontées à une double problématique. D'une part, le sel abaisse le potentiel hydrique du sol et menace l'approvisionnement en eau de la plante. D'autre part, l'absorption de sel dans les tissus foliaires empêche le bon fonctionnement physiologique des cellules. Certaines plantes, les glycophytes, ne sont pas capables de supporter le sel. D'autres plantes, les halophytes, au contraire, ont développé trois stratégies adaptatives pour assurer leur approvisionnement en eau et leur métabolisme (Munns 2005). Un premier mécanisme limite le passage des sels dans les racines et des racines vers les feuilles. Un deuxième mécanisme consiste en une compartimentation des sels dans la vacuole des feuilles. Enfin, un troisième mécanisme, récemment découvert, permet à la plante de reconduire par les vaisseaux les sels des feuilles vers les

racines puis de les ré-excréter dans le milieu (Berthomieu et al. 2003). Ce dernier mécanisme est sous le contrôle de gènes identifiés. Un gène (*SOS*, Salt Overly Sensitive) codant pour un transporteur de Na^+ s'exprime dans le phloème qui conduit la sève élaborée des feuilles vers les racines. Quand ce gène est muté, on observe une accumulation de Na^+ dans les feuilles et une diminution dans les racines. La plante mutante devient ainsi plus sensible au NaCl (Berthomieu et al. 2003).

Les Légumineuses sont plutôt des espèces dites « sodiums excludiv », et vont donc expulser les ions Na^+ au niveau de leur racine. Cependant, si la concentration saline dépasse la capacité d'exclusion, les ions Na^+ accumulés deviennent rapidement toxiques et entraînent la nécrose des organes. Ainsi, certaines Légumineuses comme *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, ou *Glycine max*, sont plus tolérantes au sel que peut l'être *Pisum sativum* (Zahran 1999).

Mais, tout comme chez bactéries, l'accumulation dans le cytoplasme de composés osmoprotecteurs (ex : K^+ , proline, sucres, bétaïne) représente, pour les plantes une stratégie majeure permettant l'ajustement osmotique quand les vacuoles accumulent des ions toxiques. Ainsi, les légumineuses soumises à un stress salin ou hydrique vont souvent accumuler de la proline, c'est en tout cas, ce qui a été observé chez des espèces telles que *Pisum sativum*, *Glycine max*, ou *Phaseolus vulgaris* (Zahran 1999).

1.2- Rhizobiums et stress salin

Les variations de l'osmolarité du milieu extérieur imposent des mouvements d'eau selon le gradient osmotique, conduisant au gonflement, voir à la lyse des cellules en milieu hypoosmotique, ou à la plasmolyse et la déshydratation en milieu hyperosmotique. Les cellules s'adaptent à ces variations de pression osmotique par des réponses physiologiques variées leur permettant de maintenir un niveau suffisant d'eau dans le cytoplasme et donc d'entretenir une pression de turgescence. L'osmorégulation garantit ainsi l'intégrité cellulaire par régulation des échanges avec le milieu extérieur, indispensable au bon développement des microorganismes.

Les bactéries symbiotiques semblent généralement plus résistantes au stress salin que les plantes hôtes, et ce, même chez les espèces connues pour leur résistance face à la salinité comme peuvent l'être certains *Acacia* ou encore *Medicago sativa*. La capacité à survivre et à croître sous condition saline diffère considérablement en fonction des souches bactériennes. Afin de maintenir un volume cellulaire approprié, et protéger les macromolécules intracellulaires, les bactéries ont recours à des osmoprotectants (Le Rudulier et al. 1984). Ces osmoprotectants peuvent être de nature très diverse. On retrouve des sucres (tréhalose, glucosylglycérol), des acides aminés (glutamate, proline), des dipeptides (N-acétylglutaminylglutamine amide), des composés N-méthylés (glycine bétaïne, proline bétaïne) ou encore des composés S-méthylés (diméthylsulfoniopropionate) (Boscari 2004). Lorsqu'ils sont disponibles dans le milieu extérieur, les osmoprotectants sont préférentiellement importés, sinon ils seront synthétisés par la bactérie. La Glycine bétaïne, fréquemment retrouvée dans le sol et la rhizosphère, est un composé couramment importé par les bactéries appartenant à la famille des *Archaea*. Ce composé peut aussi être synthétisé par de nombreuses bactéries *via* l'oxydation de la choline (Boncompagni et al. 1999).

1.3- Symbioses et stress salin

Les effets néfastes du stress salin sur l'activité du nodule sont fonction de différents paramètres, tels que l'espèce végétale et la souche bactérienne, le temps d'exposition à la salinité, la nature du sel et sa concentration (Swaraj & Bishnoi 1999). Il a été montré chez le pois chiche et le soja que les souches à croissance rapide type *rhizobium*, amélioreraient la tolérance à la salinité par rapport aux souches à croissance lente (El-Sheikh & Wood 1990). De même, l'inoculation par des souches bactériennes particulièrement résistante au sel, stimule la nodulation et la fixation azotée sous contrainte saline (El-Mokadem et al. 1991). L'impact du stress salin sur l'association symbiotique se manifeste à toutes les étapes de la formation des nodosités, et ce, dès la phase initiale. En fait, le processus d'installation de la nodosité serait plus sensible au stress osmotique, que ne l'est le métabolisme des parties aériennes de la plante et racinaire (Zahran & Sprent 1986). Ainsi, la déformation et la courbure des poils absorbants, sont fortement réduites en présence de 170 mM de NaCl, et complètement inhibées pour une concentration de 210 mM.

de NaCl chez le soja (*Glycine max*) inoculé par *B. japonicum* (Tu 1981). De même, la proportion des cordons d'infections dans les poils absorbants chez *Vicia faba* est fortement réduite en présence de sel (Zahran & Sprent 1986).

Au niveau des nodosités matures, le stress salin commence par induire une baisse de l'activité fixatrice d'azote. Une réduction de l'activité fixatrice d'azote (ARA) de 30% est observée chez les nodules de luzernes soumis à 0,15 M de NaCl pendant deux semaines (Fougere et al. 1991). Cette réduction de l'activité fixatrice d'azote semble avoir de multiples causes. La diminution des capacités photosynthétiques, due à la fermeture des stomates en réponse au déficit hydrique, limite les photosynthétats disponibles pour l'approvisionnement énergétique des nodosités. La diminution de l'activité respiratoire des nodosités, parallèlement à la réduction de la synthèse protéique, et plus particulièrement de la léghémoglobine, trahit probablement les difficultés à satisfaire les besoins en oxygène des bactéroïdes (Zahran 1999). Une relative tolérance des nodules à la salinité proviendrait de l'exclusion du sel du cortex interne et de son accumulation dans le cortex externe, c'est en tout cas ce qui a été démontré chez le soja et le lupin (Fernandez-Pascual et al. 1996). L'osmorégulation *via* des composés organiques, jouerait aussi un rôle prépondérant. Chez la luzerne soumise au stress salin, on assiste à une diminution de 40 à 50% de la teneur des principaux acides organiques, sauf pour le lactate qui augmente très fortement, principalement au niveau des bactéroïdes où il devient rapidement l'acide organique prépondérant, et contribue certainement à l'ajustement osmotique. On observe dans le même temps une forte augmentation d'acides aminés, principalement de la proline, dans les racines, le cytosol et les bactéroïdes. L'osmorégulation ne se limite donc pas aux racines, mais intervient aussi dans les différents tissus du nodule (Fougere et al. 1991).

Les champignons mycorhiziens à arbuscules sont inféodés aux plantes. Ils font face aux mêmes contraintes physiologiques que les plantes hôtes dans les milieux salés. Cependant, les effets de la salinité sur ces champignons sont moins bien connus (Smith & Read 1997). On trouve souvent des MA chez les halophytes (Allen & Cunningham 1983). Le nombre de spores diminue en général lors de fortes teneurs en sel (Abbott & Robson 1991). Les ions Na^+ et Cl^- réduisent aussi la germination des spores (Hirrel & Gerdemann 1980) et peuvent affecter le taux de mycorhization

des plantes (Pfeiffer & Bloss 1988). Cependant, de nombreuses études expérimentales montrent que les MA améliorent la tolérance des plantes au sel (Al-Karaki 2000; Al-karaki & Hammad 2001). Elles peuvent agir directement en servant de filtre pour limiter la pénétration des ions toxiques et/ou indirectement en stimulant la croissance des plantes grâce à la meilleure alimentation phosphatée et hydrique qu'elles induisent. Cette augmentation de la biomasse a un effet de dilution sur la toxicité des ions Na^+ et Cl^- .

2- Tolérance des symbioses végétales à l'inondation

2.1- Tolérance des plantes à l'inondation

L'hydromorphie correspond à une inondation continue ou temporaire des sols par l'eau. En France, plus de 2 millions d'hectares de sols forestiers sont concernés par l'inondation temporaire (Deiller et al. 2003). Cet excès d'eau peut avoir plusieurs origines : la présence ou la remontée de la nappe phréatique ou stagnante, le manque d'infiltration des eaux pluviales et l'anthropisation (endiguements, tassemments, irrigations). Comme pour les autres stress abiotiques, les plantes développent trois stratégies de réponses à l'inondation : stratégie d'échappement (cycle biologique développé en dehors du stress), stratégies d'adaptation (régulation des aquaporines) et stratégies d'acclimatation (développement de lenticelles hypertrophiées, de racines adventives, d'aérenchymes et de racines aériennes) (Glenz et al. 2006). L'inondation provoque dans la rhizosphère une forte diminution de l' O_2 (hypoxie, anoxie) et une accumulation de CO_2 , d'éthanol et d'acétaldéhyde. Une des premières conséquences physiologiques de l'inondation est la chute de la conductance stomatique. Cette fermeture des stomates résulte d'un blocage du transport racinaire d'eau consécutif à une acidification cytoplasmique (Tournaire-Roux et al. 2003). Cette acidification sert de signal à la fermeture des aquaporines (canaux hydriques) situées sur la membrane des cellules. Le blocage du transport racinaire d'eau s'accompagne d'une chute de l'activité photosynthétique et donc d'une diminution de la production de biomasse. Cependant, la croissance seule n'est pas indicatrice de la capacité de la plante à survivre à l'inondation. En effet, certaines plantes ont pour stratégies de réduire leur croissance pour s'adapter à

l'engorgement, puis de reprendre une croissance normale lorsque le niveau de la nappe est bas (Glenz et al. 2006). Quoi qu'il en soit, les plantes adaptées à l'inondation ne supportent pas une situation d'anoxie prolongée. La durée de survie des plantes peut être de quelques heures chez la tomate à trois ans chez certains arbres (*Taxodium distichum* et *Nyssa sylvatica*) de forêts marécageuses (Crawford 1982).

Les plantes les plus tolérantes à l'inondation sont celles qui développent des adaptations métaboliques et morphologiques. Les plantes tolérantes à l'hypoxie présentent un métabolisme anaérobie caractérisé par le maintien de la fermentation éthanolique, la libération de composés phytotoxiques (H_2S , éthanol), la production d'ATP et le maintien de la glycolyse. Le peu d' O_2 disponible est rapidement consommé par la respiration racinaire et microbienne (Barrett-Lennard 2003). Le manque d'oxygène affecte notamment les microorganismes qui interviennent dans la minéralisation de l'humus et favorise ceux qui sont impliqués dans la dénitrification. En effet, ces derniers peuvent maintenir leur respiration par le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire à un autre accepteur (NO_3^-) que l' O_2 . Le stress hypoxique induit la synthèse de protéines ANP « Anaerobically Induced Polypeptides » parmi lesquelles on trouve l'alcool déshydrogénase qui joue un rôle clé dans la synthèse d'éthanol.

En milieu hypoxique, les plantes développent des aérenchymes qui permettent de piéger de l'air dans un espace intercellulaire continu au travers duquel l' O_2 peut passer de la partie émergée à la partie submergée de la plante. Le volume de l'espace intercellulaire occupe entre 20% et 60% du parenchyme racinaire chez les plantes adaptées à l'inondation, alors qu'il représente moins de 10% chez les plantes les moins adaptées (Crawford 1982). Il existe aussi des lenticelles hypertrophiées sur la surface submergée des tiges et des racines de plantes adaptées à l'inondation. Ces lenticelles sont de petites excroissances de liège où peuvent se faire des échanges gazeux (CO_2 , N_2 , O_2). C'est par cette voie aussi que les plantes éliminent les produits toxiques issus de la fermentation éthanolique. Des racines adventives apparaissent sur les tiges quand le système racinaire d'origine devient incapable de fournir à la plante l'eau et les minéraux. Leur présence à l'interface entre le sol saturé en eau et l'atmosphère permet en outre une meilleure oxygénation de la plante. Pour

s'adapter à la pauvreté en O₂ du milieu, les palétuviers possèdent des racines aériennes (pneumatophores) dont le rôle est important dans l'oxygénation des racines qui se développent en milieu anaérobie (Crawford 1982).

Les MA sont répandues dans des milieux très contrastés : déserts arides, sols salins, sols pollués par des métaux lourds, milieu inondable (Smith & Read 1997). La distribution et la composition en espèces de Glomales sont souvent modifiées par l'existence de gradients dans ces milieux. Dans les sols inondables, une corrélation positive est établie entre la mycorhization et le potentiel redox du sol (Khan 1993). Le taux de mycorhization est plus faible dans un milieu inondé (faible potentiel redox) que dans un milieu exondé (fort potentiel redox). Dans ce contexte, le champignon aérobie obligatoire doit pouvoir éviter la réduction dû à l'approvisionnement en oxygène en colonisant les racines les plus superficielles (Khan 1993; Miller & Bever 1999; Stevens & Peterson 1996). Il a été en effet démontré que le taux de mycorhization de plantes semi-aquatiques est plus faible dans les racines immergées que dans les racines superficielles. Le rôle des aérenchymes et des lenticelles de la plante-hôte est à cet égard important pour assurer une bonne diffusion de l'oxygène jusqu'aux racines inondables. Il apparaît également que certains CMA sont plus tolérants à l'hydromorphie que d'autres. C'est par exemple le cas des espèces de *Gigaspora* (*G. gigantea* et *G. margarita*) qui sporulent abondamment dans des sols submergés tandis que des espèces de *Glomus* (*G. mosseae* et *G. caledonium*) sporulent mieux en période d'exondation (Anderson et al. 1984; Khan 1993). La germination des spores de *G. mosseae* est d'ailleurs inhibée en anaérobiose, mais cet effet est réversible en présence d'oxygène (Le Tacon et al. 1986).

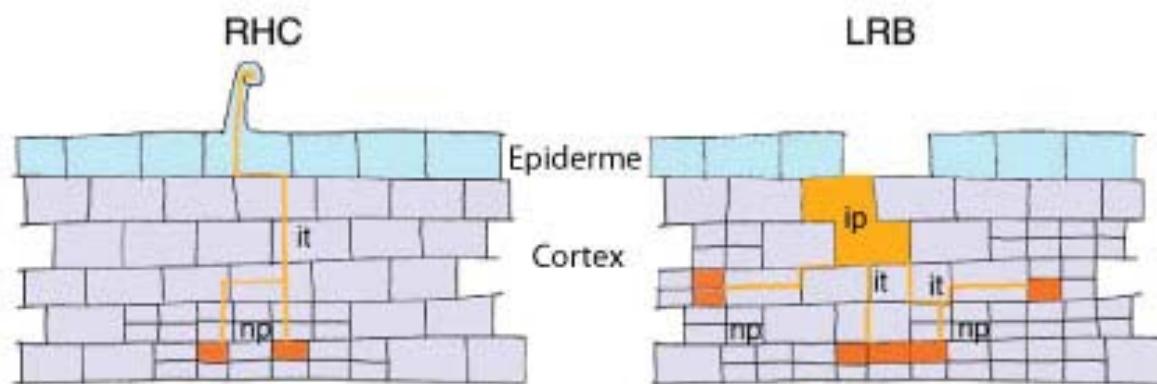


Figure 6. : Comparaison des voies d'infection chez les Légumineuses. À gauche (RCH), invasion par un poil absorbant (RCH Root hair curl invasion). Les bactéries (orange) sont emprisonnées au sein de la boucle formée par le poil racinaire et induisent la formation d'un cordon d'infection intracellulaire (it) au niveau du poil absorbant. Le cordon d'infection se développe jusqu'aux cellules du primordium nodulaire (np) où les cellules de la plante vont former une enveloppe autour des bactéries. À droite (LRB), Invasion au niveau de la base des racines latérales (LRB : Lateral root base invasion). Les bactéries (orange) colonisent les espaces intracellulaires entre les cellules corticales et induisent la formation de poches d'infection (ip) à partir desquels des cordons d'infection (it) intracellulaire et extracellulaire vont guider les bactéries jusqu'aux primordiums nodulaires (np).(Goormachtig et al. 2004)

III) L'insularité : description et problématiques

Les îles sont depuis longtemps des lieux de fascination pour les biologistes. Les différents biotopes qu'elles présentent ont inspiré Darwin et Wallace dans l'élaboration de leurs théories de l'évolution, et ont permis leur reconnaissance en tant que laboratoire évolutif (Barrett 1996). Les îles présentent souvent de forts taux d'endémisme, certainement liés à de nombreux facteurs tels que la singularité des biotopes, l'isolation génétique des populations, le déséquilibre des écosystèmes, à quoi viennent s'ajouter des forces évolutives exacerbées telles que le faible nombre de migrants à l'origine d'une population accentuant des phénomènes de dérive génétique.(Barrett 1996).

1- Dynamique de la colonisation insulaire

Peu d'études ont été réalisées sur la dynamique de la colonisation insulaire. Cependant, nous noterons celles réalisées sur les îles de Krakatao en Indonésie, situées à équidistance entre Java et de Sumatra (environ 40km). De fortes éruptions répétées, à la fin du 19ème siècle, ont éradiqué toutes vies, proposant un terrain d'étude favorable pour de nombreux scientifiques (Parrish 2002).

Dans ces îles, les premières communautés formées d'espèces hydrochores ont rapidement colonisé le littoral, pour perdurer jusqu'à nos jours. Pendant cette première phase d'installation, des prairies ont vu le jour à l'intérieur des terres, principalement composées d'espèces à fort pouvoir de dispersion aussi bien anénochères, que zoothorées. Les forêts côtières nouvellement établies ont ensuite attiré de nombreux frugivores, favorisant ainsi l'implantation d'espèces zoothorées colonisant peu à peu les prairies intérieures, jusqu'à obtenir une forêt secondaire pauvre. Ces forêts ont dès lors constitué de nouveaux biotopes favorables à l'installation de groupes d'espèces jusque-là absents, tels que les épiphytes disséminés par les vents (Parrish 2002).

La structure des communautés forestières diverge fortement entre les différentes îles de Krakatao, laissant apparaître de nombreux paramètres influençant la composition,

et la répartition floristique. Ainsi, s'il est possible de prévoir dans ces grandes lignes la dynamique de la colonisation d'un milieu insulaire vierge, différents facteurs sélectifs en interaction avec des phénomènes stochastiques interviennent (Parrish 2002). Parmi ces facteurs citons la topographie, l'hydrologie, l'activité volcanique (pluie de cendres, tremblements de terre, composition physico-chimique des sols), distances avec d'autres îles ou le continent, climat et événements climatiques extrêmes (cyclones). Il faut encore prendre en considération les caractéristiques des colonisateurs qui sont autant de paramètres pouvant influencer la composition et la répartition floristique, ainsi que divers autres facteurs tels que l'évolution, les extinctions, la compétition et la prédation (Parrish 2002).

2- L'insularité et son impact sur la structuration génétique des populations

Les populations insulaires sont souvent des populations localisées sur des territoires bien circonscrits, de petites tailles, fragmentées dues à l'existence de barrières géographiques, favorisant ainsi un haut degré d'endémisme (Barrett 1996; Frankham 1998). Cependant, les populations naturelles ne sont jamais complètement isolées et sont soumises à de nombreux facteurs pouvant affecter leur structuration génétique. Parmi ces facteurs, nous noterons les changements environnementaux dans le temps et dans l'espace auxquels elles doivent faire face comme le volcanisme, les variations du niveau marin, l'arrivée d'espèces invasives ou plus récemment les pressions d'origine anthropique. Il est donc nécessaire aux espèces de conserver un pool de diversité génétique disponible, pour survivre aux pressions environnementales excédant leurs limites de plasticité phénotypique. En deçà de cette diversité minimale, l'extinction semble très probable (Frankel 1983).

Les espèces insulaires ne représentent qu'une faible proportion des espèces mondiales, et constituent pourtant la majorité des extinctions enregistrées depuis 1600 et des espèces listées comme menacées (Frankham et al. 2002). C'est par exemple le cas des îles Hawaii, où l'on connaît 273 espèces éteintes sur un total de 1765. Cependant, ce triste record doit être relativisé, en effet, il est le fruit d'un nombre important d'études réalisées sur ces îles, et donc, a priori d'une meilleure connaissance de celles -ci. La vulnérabilité des populations insulaires est due à la faible diversité génétique, mais aussi aux aléas démographiques et

environnementaux. Les pressions d'origine anthropique croissantes sont sans aucun doute l'une des causes majeures, par la réduction drastique des aires de répartition. Plus la pression humaine est forte, plus on altère ou détruit irréversiblement des milieux fragiles, et des populations d'espèces vivantes que l'évolution et la nature avaient mis des millions d'années à façonner.

En milieu insulaire, ces processus d'altération sont accentués pour les espèces forestières. La relative longévité de ces espèces entraîne des générations chevauchantes, réduisant ainsi la taille des populations, et augmentant les aires minimales requises pour leur conservation (Young et al. 2000). Les arbres forestiers, avec leur distribution géographique variable (répartis sur presque tous les biomes terrestres, de façon plus ou moins étendue), leurs caractéristiques d'histoire de vie (grande durée de vie, accumulation de mutations, nombreux systèmes de reproduction et de dispersion), et la grande variété de stress auxquels ils sont assujettis (pollution, exploitation forestière, fragmentation, parasites) occupent une place particulière en biologie de la conservation (Bottin 2006). Et ce, particulièrement dans un monde où la fragmentation des écosystèmes augmente sous la pression de la démographie humaine et des transformations agricoles, réduisant progressivement les écosystèmes primaires à des populations plus petites et parsemées d'obstacles aux migrations. Les questions posées par l'insularité sont nombreuses, mais nous nous cantonnerons à celles abordées au cours de cette thèse :

Quel est l'impact de l'insularité sur la structure génétique des espèces endémiques ?

Quel est l'impact de la fragmentation des aires liée au milieu insulaire dans le processus d'extinction ?

Quels sont les risques d'extinction des espèces endémiques insulaires ?

Quel est l'impact des perturbations et de la dynamique du paysage sur les populations ou sous populations insulaires ?

2.1- Diversité génétique

La description de la structure génétique d'une population et de sa dynamique est basée sur l'analyse des fréquences alléliques et génotypiques pour des traits hérités de façon simple, dont la transmission suit les lois Mendéliennes (Frankham et al. 2002). Selon l'hypothèse d'Hardy-Weinberg (Hardy 1908), et dans les grandes populations se reproduisant de manière aléatoire sans générations chevauchantes, les fréquences alléliques et génotypiques restent constantes de génération en génération lorsqu'il n'y a ni mutation, ni migration, ni sélection naturelle. Cependant, cette situation idéale n'est souvent pas vérifiée en milieu naturel. Dans une population se reproduisant aléatoirement, plusieurs facteurs peuvent affecter les fréquences alléliques et ce, particulièrement en milieu insulaire. C'est le cas de la dérive génétique, de la consanguinité, des migrations et de la sélection naturelle.

2.2- La dérive génétique

A partir d'un nombre fini de géniteurs au sein des populations naturelles, l'effectif réel des populations naturelles entraîne des fluctuations aléatoires pouvant affecter les fréquences alléliques.

En milieu insulaire, les populations ont fréquemment traversé un goulot d'étranglement. Le faible nombre d'individus colonisateurs dépositaires d'une diversité génétique amoindrie par rapport à la population d'origine donne ainsi naissance à des nouvelles petites populations. On parle alors d'effet fondateur (Mayr 1963). Les individus en cause ne sont pas forcément issus de la même population et les fréquences alléliques de cette nouvelle population différeront des fréquences alléliques des populations d'origine. A la limite extrême, l'unité fondatrice peut se réduire à deux individus, voir à une seule graine si l'organisme est capable d'autofécondation. Les forces stochastiques, dont la dérive génétique, entrent en jeu dans le développement de la diversité génétique. Les populations insulaires, du fait de la surface géographique limitée, sont souvent de faible taille. Plus l'effectif efficace sera petit, plus la dérive génétique augmentera le degré de consanguinité de la population. De par leurs caractéristiques, les populations insulaires sont plus

particulièrement sujettes à l'emprise d'un régime de consanguinité. Les effets de la consanguinité sont facilement quantifiables en fonction de la diminution de l'hétérozygotie. Ainsi, il est possible de mesurer l'effet de la consanguinité en comparant la proportion réelle de génotypes hétérozygotes dans la population avec celle attendue en cas de croisement au hasard. Les populations insulaires affichent souvent des taux de consanguinité qui, pour des populations captives, correspondent à un niveau d'extinction (Hamrick & Nason 2000; Savolainen & Kuitonen 2000). Cependant il est souvent difficile de distinguer les effets de la consanguinité des effets dus aux facteurs non génétiques (environnement, démographie). Néanmoins, les interactions entre ces facteurs peuvent intensifier la vulnérabilité.

La consanguinité peut diminuer la résistance d'une population en réduisant son taux de reproduction et de survie, principalement par l'intermédiaire des allèles rares particulièrement néfastes à l'état homozygote, mais aussi en limitant fortement la plasticité génétique face à des modifications environnementales, et autres pathogènes. Cependant, il ne faut pas perdre de vue l'autofécondation et la reproduction végétative pratiquées par bon nombre d'espèces depuis des millénaires. Chez les espèces forestières exploitées, la fragmentation d'origine anthropique causée par l'exploitation subdivise les populations en des entités de faible taille, accentuant ainsi la dérive (Bottin 2006).

2.3- La migration, la colonisation et la dispersion

La migration permet une augmentation de l'aire de distribution de l'espèce, et ainsi, une meilleure probabilité de survie de l'espèce. L'arrivée d'immigrants dans une population entraîne des modifications des fréquences alléliques initiales, à moins que cette immigration ne soit compensée par une émigration de même nature. Pour des traits n'influencant pas la survie ou la reproduction comme les marqueurs neutres, les fréquences alléliques sont déterminées principalement par l'équilibre migration dérive.

Chez de nombreuses espèces, les populations sont distribuées, de façon discontinue pour cause de fragmentation, en un réseau de sous populations, présentant des migrations erratiques entre populations voisines. Ce type de réseau est appelé

métapopulation (Levins 1969). Les habitats favorables et défavorables s'alternent, et la probabilité que les individus d'une espèce donnée puissent passer d'un endroit à l'autre est relativement faible, si bien que les mouvements se réduisent. La survie d'une métapopulation dépend d'une recolonisation périodique par dispersion. Si la migration est forte, la métapopulation est assimilable à une population unique avec reproduction aléatoire. De même si la migration est faible, les populations peuvent être fortement différenciées. Alors que sans recolonisation, la métapopulation s'éteint. Les distances entre populations peuvent être particulièrement importantes en milieu insulaire, limitant d'autant plus fortement les événements migratoires, et ce notamment chez les végétaux qui sont immobiles. Le mode de dispersion, et son efficacité deviennent alors primordiaux dans la migration des espèces.

La migration, et la colonisation sont inhérentes à la dispersion, élément primordial de la biologie des populations par son influence, sur la dynamique, la persistance, la distribution et l'abondance des espèces, mais également sur la structure des communautés. La dispersion détermine le niveau des flux de gène entre les populations, et influence l'adaptation locale, la spéciation, et l'évolution des espèces (Clobert 1999).

La dispersion à travers les océans jusqu'aux îles, semble évidente, et ce particulièrement, si on se réfère à des îles fortement isolées, tel que les îles Hawaï, ou les îles Galápagos, qui ne sont pour autant exemptes de vie. La colonisation de milieux vierges ou devenus vierges artificiellement, est relativement rapide, à en juger par les différents exemples que nous offre la nature (Krakatau, Long and Ritter Island, Surtsey...), et différentes expériences réalisées avec des oiseaux ou des arthropodes. La dispersion est donc un phénomène continu, réalisé à grande échelle (Rose & Polis 2000).

De par l'absence de mobilité des espèces végétales, et les distances pouvant être particulièrement importantes en milieu insulaire, la capacité des plantes à coloniser des aires vierges fait appel à des modes de dispersion par l'intermédiaire de vecteurs. Ces vecteurs pouvant être aussi bien des courants marins (hydrochorie), le vent (anémochorie) ou des animaux (zoochorie) tel que les oiseaux.

2.4- La sélection naturelle

La sélection naturelle correspond à un tri des individus les plus aptes à survivre ou à se reproduire, conféré par un avantage sélectif quelconque, transmissible à la descendance.

Les milieux insulaires, sous l'influence de fortes variations topographies, ou climatiques (ex : la côte au vent et la côte sous le vent), présentent des habitats écologiquement diversifiés, exhibant des gradients de contraintes environnementales parfois très importants, pouvant évoluer rapidement et ce notamment pour les petites îles. Les traits phénotypiques pouvant être soumis à sélection sont nombreux chez les espèces forestières. Parmi eux, ceux que nous allons présenter dans cette étude : des traits liés à la reproduction comme la capacité des graines à flotter, mais aussi des caractéristiques liées à la survie telles que la mise en place de la symbiose, favorisant l'adaptation de l'espèce aux milieux inondés salés.

En milieux insulaires, où les populations sont souvent caractérisées par un faible nombre d'individus, pouvant même se limiter à un seul migrant, la reproduction sexuée peut devenir un frein chez les espèces monoïques et à *fortiori* chez les dioïques. Dans ce cas, l'autogamie est une solution. Bien que peu d'études se soient intéressées à cette problématique, elles tendent tout de même à montrer que les plantes autogames seraient mieux adaptées aux milieux insulaires (Barrett 1996).

Les populations endémiques insulaires se sont généralement développées à partir de petits effectifs, vivant isolées pendant de longues périodes, dans des conditions environnementales différentes du continent d'origine, au point de constituer des ensembles coadaptés, fortement structurés, résistants aux perturbations de leur milieu (Blondel 1995). Mais cette résistance acquise suite à des processus adaptatifs est aussi leur talon d'Achille, les rendant vulnérables face à espèces introduites pouvant se muer en prédateurs, compétiteurs ou en parasites et dont les conséquences peuvent être désastreuses pour tout le système. Les espèces introduites volontairement ou non par l'homme sont à ce titre des dangers potentiels

2.5-Risques d'extinction

Les populations insulaires sont, par rapport aux populations continentales, plus sujettes à l'extinction. Ainsi, depuis les années 1600 la majorité des espèces disparues sont insulaires (Frankham et al. 2002). On estime, par exemple, que parmi les seules espèces décrites, 81% des oiseaux disparus étaient insulaires. Dans le cas des angiospermes, ce chiffre est revu à la baisse avec 36% des espèces enregistrées préalablement à leur disparition vivant en milieu insulaire. Les principaux facteurs contribuant à l'extinction des espèces sont directement ou indirectement liés au développement des populations humaines. Il en découle une réduction des aires de répartition, l'introduction d'espèces, la surexploitation mais aussi des problèmes de pollution dont les influences néfastes sur la diversité et la taille des populations peut favoriser les extinctions d'origines "naturelles", dûes à l'environnement, à des catastrophes ou encore génétiques (dépression de consanguinité, baisse de la diversité génétique) (Frankham et al. 2002).

IV) La Caraïbe : description, paléogéographie et diversité des Légumineuses

L'Espace Caraïbe est un ensemble de 38 territoires dont 24 insulaires s'étalant pour une surface totale de 5,2 millions de km² (10 fois la superficie de la France métropolitaine), alors que les îles de la Caraïbe font environ 235 000 km² (soit la superficie du Royaume-Uni).

L'ensemble de la flore caraïbéenne comprend plus de 12000 espèces dont 7000 endémiques (soit près de 60%). Les originalités de la Caraïbe positionnent cette dernière parmi les cinq hauts lieux les plus importants de la biodiversité mondiale (Myers et al. 2000), englobant un large panel d'écorégions identifiées à travers le monde (WWF : <http://www.worldwildlife.org>) que sont les forêts humides, les forêts de conifères, les forêts sèches, les forêts de Cactus, les mangroves, les terres inondables.... Une écorégion est une unité relativement vaste de terre ou d'eau contenant un ensemble de communautés naturelles distinctes. Elle englobe une grande variété d'espèces, de dynamiques et de conditions environnementales, et fonctionne comme une unité de conservation. Les écorégions représentent chacune une part unique du patrimoine naturel mondial et sont encore largement méconnues. Elles subissent souvent, à des degrés divers, des dommages irrémédiables dus aux pressions humaines. Cette situation est notamment préoccupante en ce qui concerne les mangroves, et les forêts humides.

1- Paléogéographie et biogéographie des végétaux dans les néotropiques

1.1- De -100 millions d'années (milieu Crétacé) à -5 Ma :

Durant cette période, le Gondwana se disloque. Cette séparation donne naissance à ce qui deviendra d'une part l'Amérique du Sud et d'autre part l'Afrique. La plaque nord américaine et la plaque sud américaine vont glisser de part et d'autre de la plaque caraïbe initialement présente, dans ce que l'on appelle maintenant le pacifique. Au niveau du front Est de cette plaque Caraïbe se forme un arc d'îles, reliant l'Amérique du Sud au Yucatan jusqu'au milieu de l'Eocène (-49 à -39 Ma).

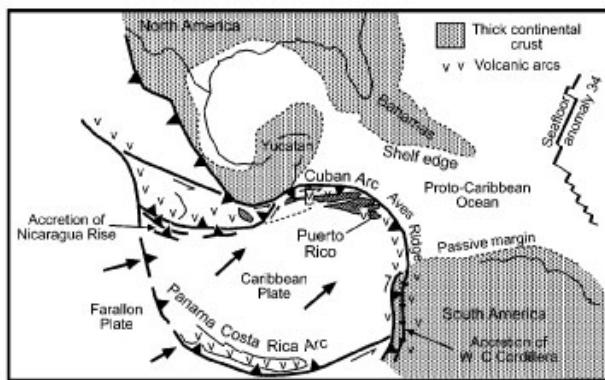


Figure 7. : Représentation de la carte géologique de l'Amérique centrale à la fin du Crétacé et au Paléocène. Ce qui deviendra par la suite l'arc antillais forme un pont reliant la plaque nord américaine à la plaque sud américaine (Pindall et al. 1988).

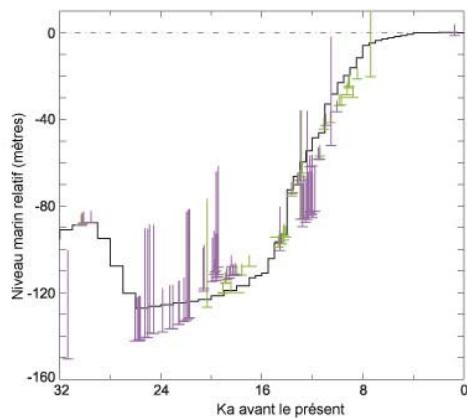


Figure 8. : Niveau marin relatif obtenu par datation des isotopes d'oxygène contenus dans des sédiments coralliens à la Barbade (Peltier & Fairbanks 2006)

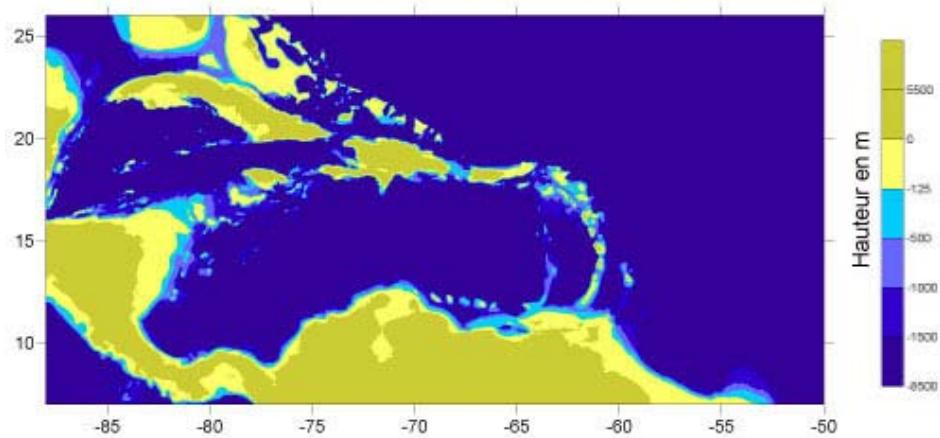


Figure 9. : Carte de la Caraïbe représentant les terres émergées lors de la dernière période glaciaire. Les terres émergées à l'heure actuelle sont en marron, les terres qui étaient émergées il y 18 000 ans sont en jaune. Carte obtenue à l'aide du logiciel surfer 8 et de données bathymétriques (1 point/minute).

L'Atlantique et le Pacifique entrent en relation, mais cet arc d'îles formant une masse de terre, nommée Gaarlandia, restera en relation avec le continent sud-américain pendant toute la période s'étalant de l'Eocène à l'Oligocène (-55 à -24 Ma) avant d'éclater pour donner les îles de la Caraïbe actuelle. Ce premier « isthme » entre l'amérique du sud et l'amérique du nord à permis à bon nombre d'espèces de migrer dans les deux sens (Figure 7) (Morley 2003; Pindall et al. 1988).

Le concept de vicariance a été redéfini par Blondel (1995) comme reposant sur le principe de dichotomie (une aire ancestrale se subdivise en deux) sans exclure catégoriquement la possibilité de polytomies (plus de deux espèces-filles) en cas d'archipelisation de l'aire d'une espèce ancestrale. Ce concept a longtemps expliqué les similitudes enregistrées entre les espèces africaines et sud-américaines. En fait, ces espèces sont issues des mêmes parents Gondwaniens, mais ont subi une évolution parallèle par leur isolement, après séparation du Gondwana. Il y a 85 Ma l'Amérique du Sud était déjà séparé de l'Afrique par 800 Km d'océan. Pourtant, les fossiles de pollen mettent en évidence différentes dispersions végétales entre l'Afrique et l'amérique du sud au cours de la période allant de -100 Ma à -6 Ma. Notons les passages de *Monocolpopollenites sphaeroidites* (ancestral Palmae), ou *Aquilapollenites* spp. (Loranthales/Santalales) entre -84 et -74 Ma. Par la suite des espèces comme *Crudia* (Légumineuse) et un type d'*Amanoa* (Euphorbiaceae) apparaissent en même temps des deux côtés de l'Atlantique durant l'Eocène (-54 à -36 Ma). Des espèces telles que *Rhizophora* (Rhizophoraceae), ou *Sympmania globulifera* (Guttiferae) vont traverser l'Atlantique au cours de l'Oligo-Miocène (-36 à -5 Ma) (Morley 2003). Ces différentes dispersions pourraient s'expliquer par des ponts de terre formés au moyen d'îles à travers l'Atlantique, permettant le déplacement de proche, en proche de différentes espèces. Parmi ces ponts transatlantiques depuis longtemps évoqués par certains biogéographes, nous retiendrons la dorsale Walvis entre l'Angola et le Brésil, ainsi que le Rio Grande rise.

1.2- De -3 millions d'années (milieu du Pléocène) à -30000 ans

L'isthme de Panama se forme, mettant en relation l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud, certaines espèces vont en profiter pour transiter entre les deux continents.

Juglans (Juglandaceae), *Alnus* (betulacea), *Quercus* (Fagaceae), se dispersent vers la Colombie respectivement aux alentours de -2,2 Ma, -1 Ma, et -300000 ans (Morley 2003)

1.3- De -26000 ans à nos jours

Il n'y a pas de changement notable par rapport à la géographie, si ce n'est la dernière période glaciaire, dont l'optimum se situe aux environs de -26000 ans. Ce détail, prend tout son importance, si l'on tient compte des variations de niveau marin (Figure 8). En effet, 18000 ans avant notre ère, le niveau de la mer était de 120 m inférieurs à l'actuel (Peltier & Fairbanks 2006), changeant radicalement la topographie des milieux insulaires (Figure 9).

2- Colonisation de l'Amérique du Sud et de la Caraïbe par les végétaux

Il y a 85 Ma l'Amérique du Sud était déjà séparée de l'Afrique par 800 km d'océan. Il a fallu près de 82 Ma, pour que l'Amérique du Sud puisse sortir de son isolement lors de sa rencontre avec l'Amérique du Nord par l'intermédiaire de l'isthme du Panama. Cette théorie considérait les espèces ayant migré, comme entités négligeables dans les similarités observées de la composition floristique des deux continents (Pennington & Christopher 2004). Les récentes études phylogénétiques moléculaires sont en train de réviser radicalement cette théorie, en introduisant une migration sur le nouveau continent à la fin du Crétacé (vers -65,5 millions d'années) et au cours du Tertiaire. Ainsi Lavin et al. (2004) a étudié une soixantaine d'apparentements intra et transcontinentaux entre des Légumineuses originaires d'Amérique du Sud, d'Afrique et de la Caraïbe. Il en ressort une dispersion comprise entre -4 et -6 Ma au niveau intra continental, et entre -8 et -16 Ma pour une dispersion transcontinentale (Lavin et al. 2004)

L'étude de fossiles originaires des anciennes forêts tropicales à feuilles caduques (début tertiaire), couplée avec l'étude phylogénétique de deux groupes de Légumineuses *Ormocarpum* et *Robinia* présentant de nombreuses espèces endémiques au sein des grandes Antilles, laisse à penser que les Légumineuses seraient installées depuis longtemps d'une part et que d'autre part les Antilles

auraient été un refuge pour des espèces issues de la province boréotropicale au cours du tertiaire, (Lavin et al. 2004)

3- Les Légumineuses dans la Caraïbe

Dans la Caraïbe, la composition du groupe des Légumineuses varie fortement d'une île à l'autre. Il ne faut pas perdre de vue que bon nombre des Légumineuses trouvées dans les champs ont été introduites par l'homme et sont devenues des banalités rudérales dépourvues de toute signification biogéographique. Il est donc nécessaire de fonder une comparaison sur les arbres autochtones. Ainsi la flore arborescente des Petites Antilles présente 6 % de Légumineuses (B. Rollet, pers. Com.), contre pas moins de 15% en Guyane Française (Roggy & Prevost 1999; Sabatier & Prevost 1994). Mais les autres flores continentales ne paraissent pas pour autant dépourvues de Légumineuses, puisqu'elles semblent là aussi bien plus riches en Légumineuse qu'au sein des Petites Antilles (Hladik, 1986).

De même, les îles des Grandes Antilles (Cuba, St Domingue, Haïti, Porto Rico) se distinguent des petites Antilles par leurs grandes richesses en Légumineuse, comparables à des régions continentales tel que le Mexique. Cette différence serait à relier au caractère de zone refuge conféré par les îles des grandes Antilles depuis le Tertiaire (Lavin et al. 2001). La présence de *P.officinalis* au niveau de la zone néotropicale serait relativement récente puisqu'estimée en palynologie au Pléistocène (-10000 et -1,8 Ma) (Graham 1995).

V) Les forêts marécageuses à *Pterocarpus officinalis* Jacq.

1.1- La forêt marécageuse à *Pterocarpus*, un écosystème en danger ?

La forêt marécageuse a fortement régressé dans les îles Caraïbes. En effet, la déforestation, à des fins agricoles, a débuté au début du XVII^e siècle en Guadeloupe, en Martinique et à Porto Rico. Sur l'île de Porto Rico, la forêt à *P.officinalis* est réduite à de simples « patch » adjacents aux mangroves dans les zones de forte salinité (Alvarez-Lopez 1990; Eusse & Aide 1999). Mais ce phénomène continue en s'accentuant dans toutes les îles des Caraïbes. Durant les cinquante dernières années, une diminution de 14% de la forêt autour de la baie de Fort-de-France a été constatée, ainsi qu'une perte de 150 hectares aux alentours de Pointe-à-Pitre, principalement dues à l'urbanisation (Imbert et al. 2000). Ceci favorise donc l'érosion des sols et le transport de solides vers le milieu marin. Il s'en suit alors la suppression des aires naturelles de décantation et filtration que ces forêts constituaient entre la terre et la mer, entraînant une dégradation générale de la limpidité des eaux côtières, ainsi qu'un phénomène d'hyper sédimentation au niveau des écosystèmes marins côtiers. Cette invasion massive de sédiments colmate les stomates du système racinaire aérien des palétuviers et entraîne donc leur mort. En plus, les rejets d'industries de canne à sucre, déversés directement en mer ou dans les rivières, sont très acides et fortement chargés en matières organiques, entraînent l'apparition de conditions anoxiques lors de leur oxydation.

(<http://www.gouv.fr/ifrecor/domtom/gutdmf.htm>).

Enfin, à une échelle de temps plus large, la salinisation des espaces côtiers résultant de l'accélération de la hausse du niveau marin pourrait réduire l'aire de répartition de la forêt (Bonhême et al. 1998)

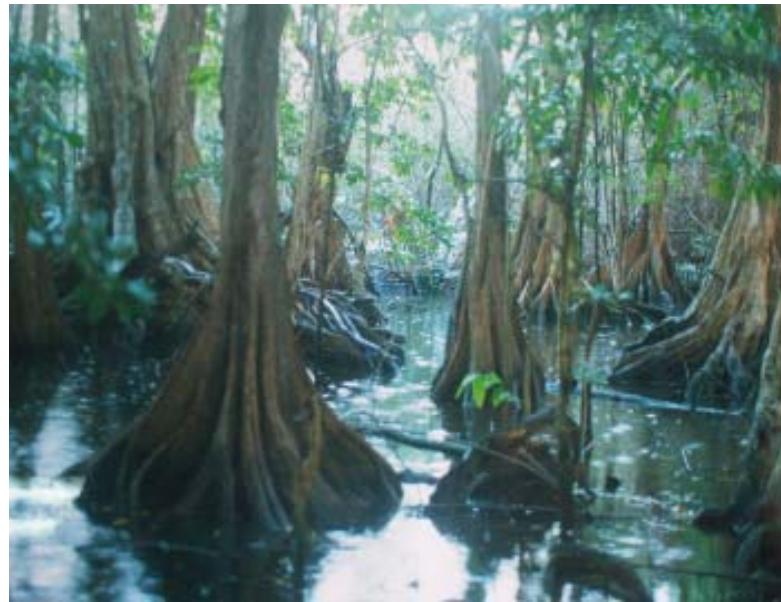


Photo 10. : Forêt à *P.officinalis* en période d'inondation (Belle-Plaine Abyme Guadeloupe)



Photo : Muller F.

Photo 11. : Forêt à *P.officinalis* (Forêt du Gallion Trinité Martinique)



Photo 12. : Pic de Guadeloupe

(*Melanerpes herminieri*)



Photo 13. : *Aechmea flemingii*



Photo : Muller F

Photo 14. : Gousse de *P.officinalis* (Belle Plaine, Abymes, Guadeloupe)

1.2- Importance écologique de cette formation

Cet écosystème constitue un habitat préférentiel ou exclusif pour des espèces végétales rares des Petites Antilles, comme *Loncharpus sericeus*, *Hymenocalis carriabaea*, et *Aechmea flemingii* (Photo 13) (Bonhême et al. 1998), ainsi qu'un refuge pour de nombreuses espèces animales comme le Canard musqué, la Buse échasse, le Pic à tête rouge, le Pic de Guadeloupe (Photo 12). De plus, le milieu marécageux constitue un maillon essentiel dans l'alimentation de nombreux poissons et crustacés qui viennent aussi s'y reproduire et se protéger d'éventuels prédateurs animaux, mais aussi humains (Brown & Lugo 1990; Cadamuro 1999). La forêt marécageuse de Guadeloupe, qui n'occupe qu'environ 400 ha dans la Réserve Naturelle du Grand Cul-de-Sac Marin, recèle une importante diversité (Bonhême et al. 1998) qu'il conviendrait de préserver tant pour satisfaire aux intérêts patrimoniaux que pour la pérennisation des ressources naturelles halieutiques.

2- *Pterocarpus officinalis* Jacq.

Le genre *Pterocarpus* doit son nom à ses graines (*carpus*) ailées (*ptero*) (Photo 14). Il appartient à la famille des Fabacées, et représente une trentaine d'espèces largement distribuées à travers la ceinture pantropicale. L'aire de répartition est très variable d'une espèce à l'autre. *P. indicus* est à large distribution sur de nombreux continents, alors que des espèces comme *P. orbicalatus* se cantonnent au Mexique. Près de la moitié des *Pterocarpus* sont représentés en Afrique et en Amérique du Sud. Seules trois espèces apparaissent dans la Caraïbe : *P. macrocarpus* que l'on retrouve aussi en Amérique du Nord et en Asie, *P. santalinoides* présent en Afrique et en Amérique du Sud, et pour finir l'espèce *P. officinalis* strictement américaine.

P. officinalis Jacq a été décrit par le botaniste autrichien Nikolaus von Jacquin lors d'un voyage d'étude aux Petites Antilles commandité par Francis 1^{er} entre 1755 et 1759. L'espèce *P. officinalis* endémique de la zone Caraïbe et l'espèce *P. gilletii* originaire d'Afrique de l'Ouest ont longtemps été considérées comme une seule et même espèce. Il a fallu attendre 1972 (Rojo 1972) pour que ces deux espèces de *Pterocarpus* soient distinguées .

2-1- Habitat

L'espèce *P. officinalis* est largement distribuée dans la zone néotropicale comprise entre les latitudes 20°Nord et 2°Sud (Pennington & Sarukhan 1968; Rojo 1972). On la retrouve aussi bien dans tout l'arc des Caraïbes, sur l'île de Porto Rico, en République Dominicaine, dans le Sud du Mexique, en Amérique Centrale (Belize, Costa Rica, Honduras, Nicaragua, Panama) et dans toute la partie Nord de l'Amérique du Sud (Brésil, Colombie, Equateur, Guyane française, Surinam, Venezuela) (Allen & Allen 1981; Little & Wadsworth 1964).

2-2- Caractères botaniques

De par sa large dissémination tout autour de la mer des Caraïbes, *P. officinalis* présente de nombreux noms vernaculaires souvent en relation à son latex rouge sang : « mangle sang » (créole guadeloupéen), « mangle médaille » (Guadeloupe, Martinique), « moutouchi rivière » (Guyane), « bloodwood » « Sangre de drago » et « Palo de pollo », (pays hispanophones). *P. officinalis* peut atteindre 40m de haut à maturité pour un diamètre de 60 à 90 cm à sa base (Little & Wadsworth 1964; Weaver 1997). Ses feuilles sont luisantes et composées, ses fleurs jaunes et odorantes sont pollinisées par les abeilles. Le rythme de reproduction sexuée de cet arbre est régulé par le régime pluviométrique. Ses fruits sont des gousses plates, circulaires, ailées et monospermes, capables de germer alors qu'elles flottent sur l'eau. Toutefois, le développement d'un appareil racinaire au niveau de la graine n'intervient que si le niveau de l'eau est inférieur à 3-4cm, ce qui limite considérablement la répartition de cette espèce (Alvarez-Lopez, 1990).

2-3- Adaptations à la salinité et à l'inondation

Compte tenu de son milieu de vie, *P. officinalis* développe des adaptations morphologiques et physiologiques au déficit en oxygène, à l'instabilité du substrat et à la salinité (Cintron 1983 ; Alvarez-Lopez, 1990).

Des lenticelles, des aérenchymes et des racines superficielles permettent la circulation du CO₂, de l'O₂ et du N₂. De majestueux contreforts augmentent la stabilité de l'arbre dans les sols marécageux. Les jeunes plants *P. officinalis* tolèrent

jusqu'à 10g/L de NaCl et présente une bonne capacité à se développer en milieu inondé (Dulormne et al. 2006 en préparation). Il développe des symbioses avec des *Bradyrhizobium* et des champignons mycorhiziens à arbuscules dans son milieu (Bâ et al. 2004).

2-4- Intérêts de l'espèce

P. officinalis possède un latex rouge sang exsudé au niveau de coupes et blessures diverses aux propriétés pharmacologiques : il favorise la cicatrisation des plaies, peut participer au soin des boutons de fièvre d'origine herpétique, et présente des qualités hémostatiques et astringentes (Bacon 1990). Sa gomme possède des propriétés en matière d'extraction de colorants (Bonhême et al. 1998). Son bois blanc à nervure rouge sang est utilisé pour son esthétique dans l'artisanat par les Saramacas de Guyane. Il a été exploité en Guadeloupe pour alimenter les distilleries ainsi que les fours à chaux jusqu'au milieu du siècle (Alvarez-Lopez 1990).

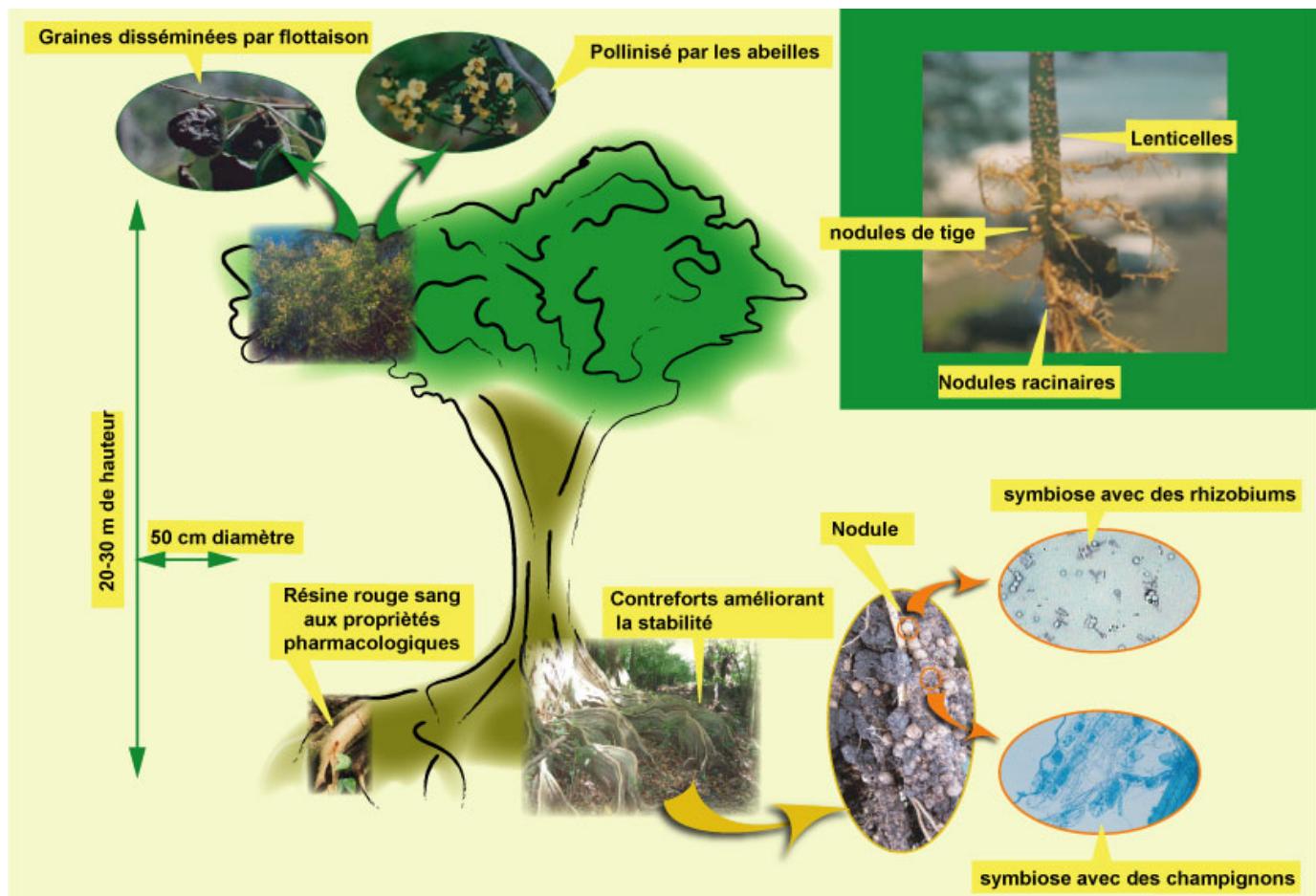


Figure15. : Représentation schématique de la biologie de *Pterocarpus officinalis* Jacq.

Chapitre 1 : échantillonnage et marqueurs génétiques

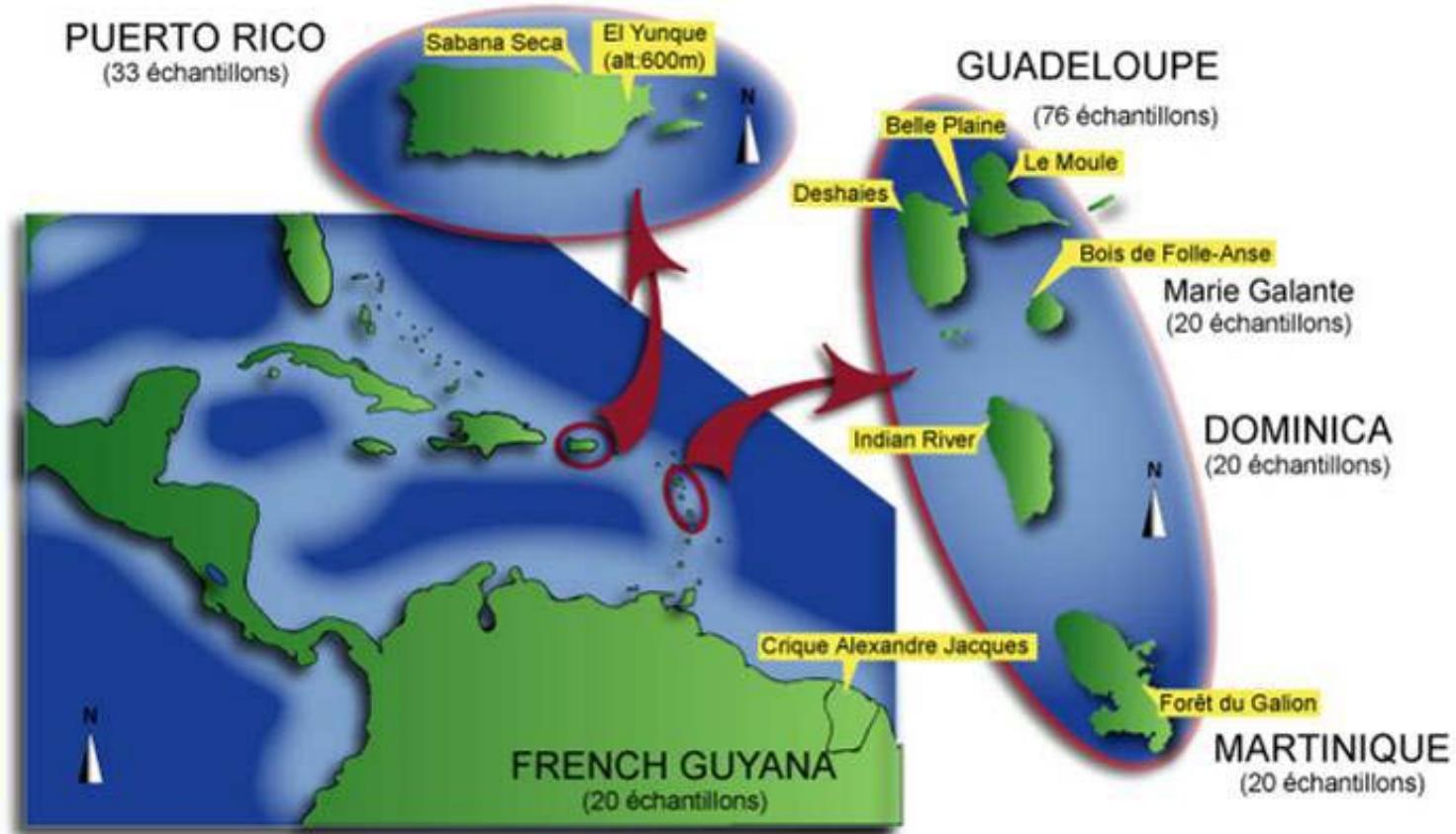
I) Sites d'échantillonnage

Des prospections ont été réalisées en 2003 et 2004 au début de la saison pluvieuse (mars-avril) dans des forêts marécageuses de quatre îles des Petites Antilles (Guadeloupe, Marie-Galante, Martinique et Dominique), dans une île des Grandes Antilles (Puerto Rico) et en Guyane française (Figure 16).

La Guadeloupe

L'île de la Guadeloupe, située à une latitude moyenne de 16°20N, couvre une superficie de 1438 Km². La Guadeloupe héberge la plus grande forêt à *Pterocarpus* des Petites Antilles. Cette formation se localise surtout autour du Grand Cul-de-Sac Marin, principalement au niveau du site de Belle-Plaine (Abymes). On note aussi la présence d'autres populations réparties sur le littoral de la Grande-Terre et de la Basse-Terre. Certaines couvrent plusieurs hectares, d'autres ne comprennent que quelques individus.

Pour approcher au mieux la diversité infra-spécifique de *P. officinalis* et de sa microflore associée, on a sélectionné des populations aussi distantes que possible. Sur le littoral Atlantique de la Grande-Terre, le peuplement de la ravine du Nord-ouest (Le Moule) représente la station la plus orientale de la Guadeloupe. À l'opposé, la Grande-Anse de Deshaies située sur la côte-sous-le-vent de la Basse-Terre, est le peuplement le plus occidental de Guadeloupe. Le site de Belle-Plaine (Abymes), partiellement inclus dans la Réserve Naturelle du Grand Cul-de Sac Marin, a fait l'objet d'un protocole particulier permettant d'étudier la variabilité intra-site le long d'un gradient de salinité.



L'étude de la diversité des rhizobiums a été étendue à neuf autres sites (Viard, Jarry, Pointe à Bacchus, Rivière-Bananier, Port-Louis, Pointe à Retz, Blain, Belle-Plaine Gosier et Grande Ravine) situés en Grande Terre et Basse Terre (Figure 17).

Deshaines

Le peuplement étudié est situé dans la Grande Anse de Deshaies. La situation topographique et hydrologique est comparable à celle des alentours de Portsmouth (Île de la Dominique). La toponymie créole, en l'occurrence, rend compte de cette similitude. La rivière Mitan qui se jette dans la Grande Anse, détermine une lagune aujourd'hui très altérée par l'exploitation d'une gravière. Le cordon littoral sableux qui constitue la plage, contrôle le débit de l'estuaire de sorte que la lagune ne s'assèche pas et que l'eau salée n'y pénètre que sporadiquement. Les *Pterocarpus* se développent sur un fond sableux mais constamment irrigué même en période sèche où la nappe affleure.

Le Moule

Le peuplement est ici réduit à un liseré de quelques mètres de largeur (ou parfois quelques dizaines de mètres de largeur), se développant le long du fond marécageux, au pied des collines calcaires. Les *Pterocarpus* ne peuvent se développer sur les pentes drainées, mais ils ne peuvent pas non plus investir les fonds marécageux qui sont ici hyper-salés. La mangrove elle-même ne parvient à se maintenir que dans quelques secteurs où l'eau circule fréquemment. Les salinités mesurées en saison sèche, aux pieds des *Pterocarpus*, restent basses (5 à 7 g/l) alors qu'à quelques mètres, la salinité est létale pour *Avicennia*. Les *Pterocarpus* se développent sur de la vase ou de la tourbe selon le lieu. Par endroit, leurs racines sont en contact avec l'argile et les roches calcaires du relief avoisinant.

Belle-Plaine (Abymes)

Le site de Belle-Plaine a été sélectionné pour évaluer l'adaptation des *Pterocarpus* ou de leurs hôtes bactériens et fongiques, aux contraintes mésologiques. En première approche, on considère que ces contraintes sont de deux natures: le niveau

d'inondation et la salinité de la solution du sol. Ces deux contraintes ne sont pas indépendantes et varient au cours du temps. On ne peut exclure l'incidence d'autres contraintes, mais la salinité et l'inondation sont certainement les facteurs limitants majeurs de la forêt marécageuse. On s'attend par suite à ce qu'elles déterminent les modalités des symbioses *Pterocarpus-Rhizobium*-champignons mycorhiziens à arbuscules. Afin de documenter les études entreprises, il était nécessaire d'obtenir une cartographie de ces facteurs prépondérants.

La salinité

La salinité varie au cours du temps. Des mesures de salinité superficielle ont été réalisées le 30 septembre 2000, dans les prairies qui longent la lisière de la forêt marécageuse et le long d'un transect nord-sud de 450 m. Le mois de septembre est situé en pleine saison des pluies, mais il correspond aussi à un niveau marin moyen presque maximum (précisément 96% du niveau marin maximum qui intervient en août). Le profil de salinité relevé fait apparaître une salinité de 23 g/l à proximité du Canal Perrin qui s'abaisse à 4 g/l 350 m plus au Sud. Il est intéressant de constater que le gradient n'est pas régulier, mais qu'une baisse brutale de la salinité intervient à 170 m du Canal Perrin, soit 20 m au Sud du contact entre la mangrove et la forêt à *Pterocarpus*. Dans la forêt marécageuse, au voisinage de l'interface avec la mangrove, les mesures disponibles de salinité superficielle montrent des variations allant de 9 g/l à plus de 20 g/l. Au centre du peuplement, les mesures effectuées varient de 2g/l à 5 g/l. Les mesures rapportées par Delsanti en (1999) ont permis de tracer des cartes de salinité et de réaliser la coupe transversale qui devrait approximativement s'appliquer au transect « diversité ».

L'inondation

Le degré d'inondation dépend directement de la topographie locale, mais aussi, dans certaines situations, du débit local de l'eau. Dans la mesure où l'eau ne peut circuler librement au-dessus du sol, la percolation peut être freinée au point de retarder l'établissement de l'équilibre hydrostatique. On peut alors supposer qu'en période d'inondation modérée, les hauteurs d'eau dans deux mares distantes diffèrent durablement. Les sites proches des résurgences ou des écoulements préférentiels

pourraient être ainsi recouverts d'une lame d'eau plus épaisse que les sites qui en sont éloignés. Les estimations actuellement disponibles se fondent sur des observations qualitatives ou sur des mesures ponctuelles non simultanées. Des mesures réalisées en période d'inondation maximale, permettront de préciser la topographie fine le long du transect « diversité ». Pour l'heure, on distingue trois modalités d'inondation :

- Un niveau moyen qui recouvre la plus grande partie de la formation ;
- Un niveau faible correspondant à des terrains moins inondés que la moyenne (ou moins longtemps submergés) ; ces terrains se répartissent au sud de la forêt de *Pterocarpus* ;
- Un niveau élevé correspondant à des dépressions profondes qui se trouvent essentiellement dans le centre du peuplement.

Si les niveaux d'inondation et de salinité sont soumis aux fluctuations saisonnières du bilan hydrique et du niveau marin moyen, ils sont aussi dépendants de phénomènes climatiques plus courts tels que des sécheresses occasionnelles. Ils sont *a fortiori* influencés par les variations inter-annuelles extrêmes qui caractérisent les climats tropicaux.

Marie Galante

Marie Galante est une île appartenant à l'archipel guadeloupéen couvrant une superficie de 158 Km². Les *Pterocarpus* échantillonnés sur ce site, appartiennent à la grande formation marécageuse qui occupe la plaine littorale occidentale de Marie-Galante et qu'un cordon littoral sableux isole de la mer. Le cordon littoral héberge la plus grande forêt sur sable de l'archipel de la Guadeloupe : le bois de Folle-Anse. La formation marécageuse à *Pterocarpus* a été en partie défrichée et drainée pour l'établissement de prairies ou de champs de canne à sucre. De vastes marécages herbacés se sont sans doute développés à cette occasion. Les tâches de *Pterocarpus* subsistent, notamment dans les dépressions ou le long des cours d'eau. D'autres espèces accompagnent le mangle médaille ; certaines sont électives des terrains inondés comme *Annona glabra*, mais d'autres appartiennent aux forêts de terre ferme. Ce dernier cortège suggère l'existence avant défrichement, à l'amont de

la plaine des mangles, d'une mosaïque de peuplements inondés et exondés. Malgré cette possibilité, il demeure que les différents bois de *Pterocarpus* actuellement distincts, appartiennent tous à une même population initiale.

La plaine inondable est alimentée par l'eau terrigène drainée du plateau des Hauts. Une part importante de ces eaux est canalisée par la Rivière de Saint-Louis. Dans la partie amont de la plaine littorale où les récoltes ont été réalisées, le substrat est argileux ou tourbeux, selon le degré d'inondation. L'eau est douce même en période d'étiage.

Dominique

La Dominique est une île, à mi-chemin entre l'archipel guadeloupéen et la Martinique, située à une latitude moyenne de 15°42N, elle couvre une superficie de 754 Km². Les trois stations étudiées dans l'île de la Dominique, sont situées à proximité immédiate de Portsmouth, le second port du territoire. Cette petite ville de la côte caraïbe est établie dans le fond d'une vaste baie (Prince Rupert Bay) comme d'ailleurs le souligne son nom créole de « Grand-Anse ». Dans le contexte montagneux général de l'île, la baie correspond à une plaine littorale basse où convergent plusieurs petites rivières ; les plus courtes sont des « ravines » au débit intermittent, la plus grande est l'Indian River.

Guyane française

Les échantillons de *Pterocarpus* ont été prélevés sur le site de la forêt marécageuse de la crique Alexandre Jacques (affluent du cours inférieur du Sinnamary), dans lequel *P.officinalis* représente environ 25% de la strate arborée, et 37,5% des Légumineuses nodulées.

Porto Rico

A Puerto Rico, la forêt marécageuse à *P. officinalis* couvre environ 167 ha (Alvarez-Lopez, 1990 ; Eusse & Aide, 1999). On la trouve en arrière de la mangrove, et notamment dans le site de Sabana Seca, à 600 m d'altitude. Dans ce site, la strate arborée de la forêt marécageuse est dominée à 100% par l'espèce *P. officinalis* qui est soumise à un gradient de salinité variant entre 9g/l et 15g/l selon la topographie du milieu (Eusse & Aide, 1999).

Des échantillons (arbres 1 à 11 en milieu non salé ; arbre 12 à 20 en milieu salé en arrière de la mangrove) ont été prélevés. Les caractéristiques pédo-climatiques du site de Sabana Seca sont comparables à celles de Belle Plaine en Guadeloupe. D'autres échantillons (arbres 21 à 35) ont aussi été prélevés dans le site El Yunque situé en montagne à 1100 m d'altitude. Dans ce site, on ne trouve jamais les *Pterocarpus* sous forme de peuplement, mais isolés sur des sols sableux le long des cours d'eau. Ils sont toujours inondés par l'eau des rivières. Le taux de salinité y est très faible de l'ordre de 0,03g/l (Alvarez-Lopez, 1990). Ce site n'est pas soumis à des intrusions salines et rappelle celui de Paracou en Guyane française.

2/ Plan d'échantillonnage

Dans chaque site de Guadeloupe (Le Moule et Deshaies), de Marie-Galante (Folle-Anse), de Martinique (Galion), de Dominique (Indian River), de Guyane (Paracou et Malmanoury) et de Puerto Rico (Sabana Seca et El Yunque), un échantillon de 20 individus a été prélevé au sein d'une même population de *P. officinalis*. Des nodules et des feuilles ont été récoltés sur les mêmes individus pour une analyse de la variabilité inter-population entre les sites et intra-population à l'intérieur de chaque site. Un échantillon total de 180 individus a été analysé.

Dans chacun des neuf autres sites de Guadeloupe (Viard, Jarry, Pointe à Bacchus, Rivière-Bananier, Port-Louis, Pointe à Retz, Blain, Gosier et Grande Ravine), 3 individus ont été échantillonnés au sein d'une même population de *P. officinalis*. Des nodules ont été récoltés pour une analyse de la diversité des rhizobiums. Un échantillon total de 30 individus a été analysé.

Le site de Belle-Plaine (Abymes) en Guadeloupe a été choisi pour une étude plus fine de la variabilité des *Pterocarpus* et de la microflore associée en fonction de contraintes édaphiques (salinité et hydromorphie) le long d'un transect nord-sud d'environ 1,8 km de long. Des feuilles, des nodules, des racines et du sol ont été récoltés tous les 50 m. Un échantillon total de 36 individus récoltés a été analysé (Figure 18).

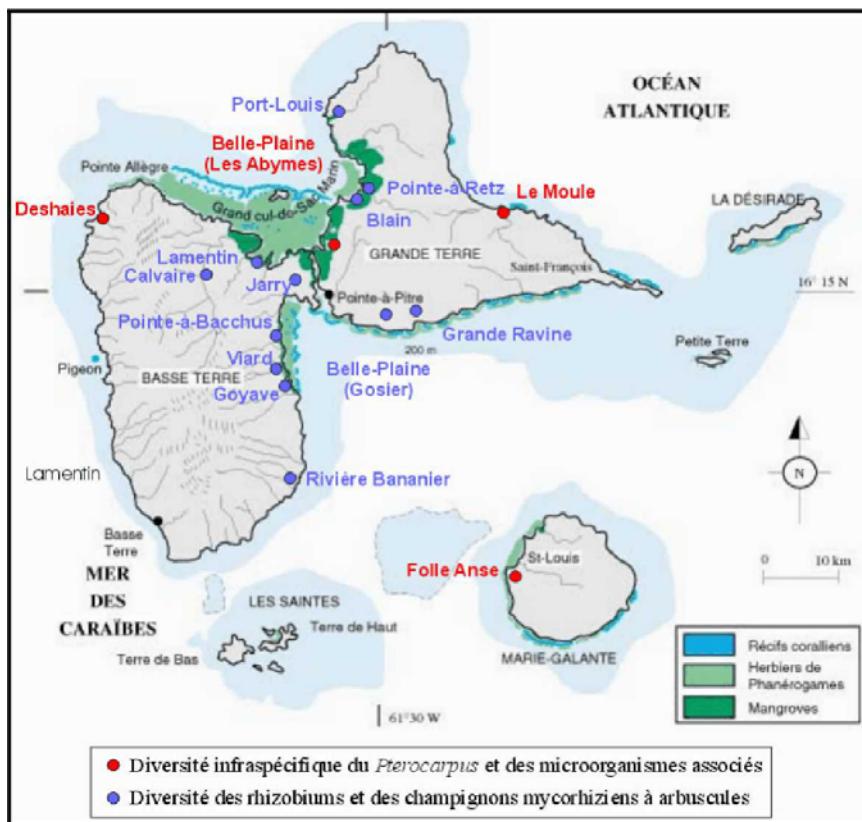


Figure 17. : Les sites d'échantillonnage dans les forêts marécageuses de Guadeloupe (D'après Bouchon)

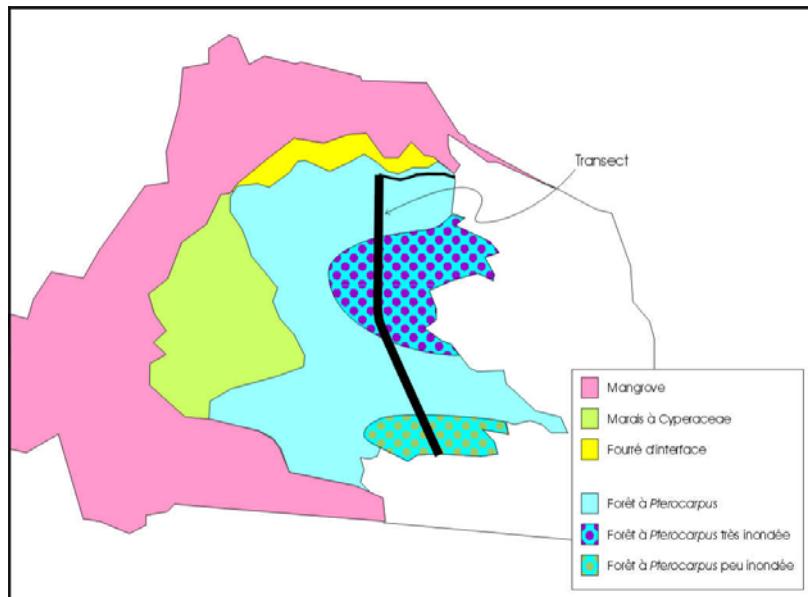


Figure 18. : Le transect étudié dans la forêt marécageuse de Belle-Plaine (Abymes)

3/ Les marqueurs génétiques de l'étude

Séquences ITS

Le terme ITS est l'abréviation pour « internal transcribed spacer », correspondant à une région génétique « non codante », comprise entre les ADN codant pour les sous-unités des ARN ribosomaux 16S et 23S. Cette zone génétique constituée de l'ADNr 16S, d'un ITS contenant l'ADN codant pour deux ARNt, et l'ADNr 23S présente une structure particulière faite d'une succession de domaines dont les vitesses d'évolution sont très variables, s'étalant de relativement élevée à presque nulle. Chacun de ces domaines a son importance pour l'identification moléculaire des micro-organismes. Certaines parties de cette zone génétique sont identiques chez toutes les bactéries et donc utilisables comme sites de complémentarité pour des amorces universelles de séquences ou d'amplification. La comparaison des domaines conservés permet de retracer les liens de parenté qui unissent des bactéries éloignées, tandis que les domaines à vitesse d'évolution plus rapide permettent l'étude des relations phylogénétiques d'espèces plus proches. Les séquences codantes des ARN 16S et 23S sont couramment utilisées pour assigner une espèce à un genre, ou déterminer une espèce au sein d'un genre. Ainsi, les séquences d'ADNr 16S ont largement contribué à la compréhension des relations entre les bactéries (Willems et al. 2003). Cependant, certaines espèces distinctes ont parfois les mêmes séquences 16S ou 23S, et au sein d'un même génome, les différentes copies de ces sous-unités ribosomiques peuvent présenter des séquences différentes. Au sein d'un genre, les séquences d'ADNr 16S sont généralement fortement conservées limitant ainsi les informations taxonomiques pouvant être déduites de leur comparaison (Willems et al. 2003).

Les séquences ITS sont plus polymorphes et présentent des variations importantes tant au niveau de leur longueur que de leur séquence, même chez des espèces proches (Gürtler & Stanisich 1996). C'est cette particularité qui permet d'entreprendre l'alignement des similarités des séquences d'espèces génétiquement proches, appartenant généralement au même genre. Les séquences ITS sont

maintenant fréquemment utilisées pour des études de diversité au sein d'une espèce, le plus souvent combiné avec d'autres méthodes de génotypage.

Microsatellites nucléaires

Les séquences microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats) sont des marqueurs génétiques couramment utilisés dans de nombreux domaines de la biologie, que ce soit en biologie des populations, en écologie des populations, en biologie de la conservation, en épidémiologie ou en encore en médecine légale.

Les principales caractéristiques des microsatellites nucléaires par rapport aux allozymes et aux RAPDs, deux autres marqueurs couramment utilisés en biologie des populations, sont présentés dans le Tableau 19 (extrait de Jarne et Lagoda, 1996).

Les séquences microsatellites sont des séquences d'ADN constituées de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétranucléotiques (Figure 20), mais dont la taille totale est inférieure à 100 paires de bases. Ces séquences sont abondantes et largement distribuées dans les génomes eucaryotes. On estime, chez les végétaux, le taux de séquences microsatellites à une tous les 64,6 kb pour les monocotylédones, et une tous les 21,2 kb chez les dicotylédones. Leur succès croissant en tant que marqueurs moléculaires s'explique aussi par leur caractère codominant, leur nature multiallélisque, ainsi que par leur grande reproductibilité expérimentale (Varshney et al. 2005). En génétique, ils sont particulièrement attractifs par leur polymorphisme élevé, dû à un taux de mutation pouvant être très important en fonction de l'espèce étudiée, de leurs motifs et de leurs localisations (environ 10^{-2} à 10^{-5}). Ce fort taux de mutation proviendrait de « dérapages » de la polymérase sur ces répétitions de nucléotides lors de la réPLICATION des chromosomes engendrant des insertions ou des délétions. Leur faible présence au sein de séquences codantes s'expliquerait par une contre sélection en réponse à leur instabilité (Jarne & Lagoda 1996). Mais si ce fort taux de mutation caractérisant les microsatellites est à l'origine de leur intérêt, il est aussi la cause de certains inconvénients. C'est le cas des allèles nuls pouvant provenir d'une modification au sein du site d'hybridation des amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification.

De même le jeu des mutations successives peut amener un même locus microsatellite, à présenter une taille identique chez différents individus sans pour autant provenir du même allèle ancestral. Ce dernier phénomène, nommé homoplasie, tout comme les allèles nuls, peut induire des erreurs d'interprétation concernant la structuration des populations.

Microsatellites chloroplastiques

Tout comme dans le génome nucléaire, des séquences microsatellites sont aussi présentes au niveau de l'ADN chloroplastique des végétaux. Ces microsatellites chloroplastiques sont formés par la répétition d'un motif, le plus souvent poly-A, le polymorphisme de ces séquences concerne donc le nombre de nucléotides « A ». Là aussi, ils se caractérisent par un taux de mutation important, mais somme toute bien plus faible que dans le cas des microsatellites nucléaires. Cette caractéristique permet aux microsatellites chloroplastiques de révéler des histoires évolutives plus anciennes que les microsatellites nucléaires, tout en montrant une importante variabilité intra-spécifique. La transmission uniparentale (généralement maternelle chez les angiospermes et paternel chez les gymnospermes), la nature haploïde et non recombinant du génome chloroplastique, la possibilité d'utiliser des amorces dites « universelles » (Bryan et al. 1999; Weising & Gardner 1999), et l'absence d'hétéroplasmie font des microsatellites chloroplastiques des outils de choix pour étudier l'évolution et la phylogéographie. La contribution des flux de gène par le pollen et les graines à la structuration des populations naturelles, peut être étudié en comparant les marqueurs nucléaires, aux marqueurs chloroplastiques (Provan et al. 2001).

	Microsatellites		
Caractéristiques	Allozymes	RAPDs	nucléaires
Codominance	oui	non	oui
Neutralité	douteuse	oui	oui
Embryon/juvénil pouvant être marqué	rarement	oui	oui
Adulte pouvant être marqué	oui	oui	oui
Nombre de loci variables analysés	10-50	10-100	5-20
Nombre d'allèles par locus	1-5	2	1-50
Information moléculaire (structure, mutation)	rarement	rarement	disponible
Nombre d'individus pouvant être marqués par unité d'effort	1	1	0,2-0,4
Coût relatif par individu	1	1	3-4

Tableau 19. : Comparatif des principales caractéristiques des microsatellites nucléaires par rapport à deux autres marqueurs couramment utilisés en biologie des populations : les allozymes et les RAPDs (extrait de Jarne et Lagoda, 1996).

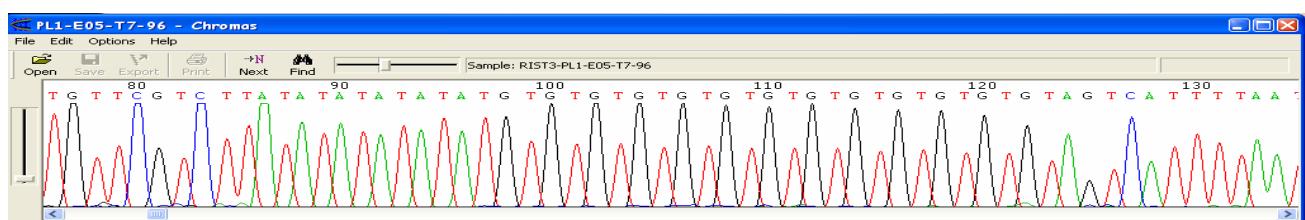


Figure 20. : Chromatogramme d'une séquence microsatellite $(TA)_6(TG)_{12}$ visualisée à l'aide du logiciel Chromas 1.45.

Introduction à la publication 1

Afin d'analyser la diversité, les flux de gènes et la structuration entre les individus et les populations étudiés, nous avons choisi les marqueurs microsatellites nucléaire et chloroplastique. La méthode d'analyse de marqueurs microsatellites est basée ici sur la technique d'amplification de fragments d'ADN (1000 à 4000 paires de bases environ) à l'aide d'amorces nucléotidiques et d'une enzyme, la Taq polymérase (méthode dite de PCR : Polymerase Chain Reaction). Cette méthode permet, après migration des fragments amplifiés sur un gel d'acrylamide soumis à un champ électrique, de déceler des mutations de type insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotides.

L'étude du génome chloroplastique, de par son faible taux de mutation et de recombinaison (Olmstead & Palmer 1994), permet l'utilisation d'amorces dites « universelles » d'une vingtaine de paires de bases. Ces amorces rendent possible l'amplification spécifique d'une même zone génique chez un grand nombre d'espèces d'Angiospermes. Contrairement au génome chloroplastique, l'étude du génome nucléaire, nécessite de définir des amorces spécifiques à l'espèce étudiée. Chez *P. officinalis*, huit loci microsatellites nucléaires révélant du polymorphisme ont été isolés et nommés : mPoCIRE01, mPoCIRE04, mPoCIRF08, mPoCIRH02, mPoCIRE09, mPoCIRH08, mPoCIRH07 et mPoCIRF03. La mise au point de ces paires d'amorces est présentée dans la publication I (Muller et al. 2006)

Publication I

Isolation and characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq.

FÉLIX MULLER, ALEXANDRE VAILLANT, AMADOU BÂ and JEAN-MARC BOUVET
Molecular Ecology Notes (2006) **6**, 462–464

PRIMER NOTE

Isolation and characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq.

FÉLIX MULLER,*†‡ ALEXANDRE VAILLANT,* AMADOU BÂ† and JEAN-MARC BOUDET*

*CIRAD Département Forêts 'diversité génétique et amélioration des espèces forestières', Campus international de Baillarguet TA 10/C 34398 Montpellier cedex 5, France, †Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles et de la Guyane, BP. 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France, ‡Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 1063 IRD/INRA/CIRAD/ENSA-M/UM2, Campus international de Baillarguet, TA 10/J, 34398 Montpellier cedex 55, France

Abstract

The leguminous *Pterocarpus officinalis* Jacq. is one of the dominant freshwater wetland tree species in the Caribbean basin. Anthropomorphic factors threaten to reduce its population. In order to investigate the genetic diversity and structure of this species, we developed eight pairs of primers for nuclear microsatellites. One hundred ninety-one individuals were analysed within nine Caribbean and continental populations. These loci were polymorphic in all the populations, with four to 20 alleles per locus. Significant Hardy-Weinberg deviation was detected and was interpreted as a result of Wahlund effect. These loci constitute a powerful tool to investigate the genetic patterns within populations of the swamp species *P. officinalis*.

Keywords: conservation, insularity, nuclear microsatellites, population genetic structure, *Pterocarpus officinalis* Jacq.

Received 27 September 2005; revision accepted 1 December 2005

Pterocarpus officinalis Jacq. is a leguminous forest tree species endemic to Caribbean swamp forests. Tropical marshy forests represent less than 2% of the Earth's emerged land. The major characteristic of this forest is temporal flooding with saltwater or freshwater during part of the year. These types of swamp forests are not well known both with regards to their structure and to their dynamics (Rivera-Occasion *et al.* 2002), in particular in the insular context (Guadeloupe and Martinique) and continental (French Guiana). *Pterocarpus officinalis* forests are present in different environments, within small islands or on the continent. To understand population dynamics and to implement a strategy for conservation of the species, it was decided to assess the genetic diversity and the structure of the populations on some Caribbean islands and on the continent. We chose nuclear microsatellite markers, which also allow the assessment of the mating system and the gene flow between populations. No nuclear microsatellite has been identified in *P. officinalis* species. In

this paper, we report on the development of microsatellite primers from *P. officinalis* and their polymorphism in the Caribbean islands of Guadeloupe (4 populations), Puerto Rico (2 populations), Dominique (1 population), Martinique (1 population) and on the continent with French Guyana (1 population). Population samples were collected along rivers, in mountains and in wetland areas adjacent to mangrove. Twenty to 30 adult trees were randomly sampled and a total of 191 trees were selected. Two to five young to adult leaves were collected on each tree and dried in a plastic bag containing 10 g of silicagel. The leaves were then separated from silicagel and kept in a dry room at 20 °C.

Our genomic library was constructed using DNA sample from an individual that belongs to the Belle Plaine area population, which is located in the southeast of Guadeloupe.

Total DNA was extracted from 100 mg of dry leaf material using a mixed alkyltrimethylammonium bromide (MATAB) method derived from Bousquet *et al.* (1990), with one additional chloroform-isoamyl alcohol (24:1) extraction. Three micrograms of this purified total DNA was used to construct a (GA)_n and (CA)_n repeat-enriched genomic library,

Correspondence: Felix Muller, Fax: +33 4 67 59 37 33; E-mail: felix.muller@cirad.fr

Table 1 Development, screening and polymorphism of eight nuclear microsatellites for *Pterocarpus officinalis* Jacq. Accession no. in the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Nucleotide Sequence Database

Locus	Accession	Primer sequence	Motif	Allele size range (bp)	Annealing temperature	No.	n	H_E	H_O	P value
mPoCIRE01	AJ972377	5' CTACCGTCCCCGATAAGGC 3' 5' GCGAGAGGGCTAGATCAAGC 3'*	(TG) ₁₃	233–239	54 °C	4	157	0.49	0.50	1.10 ⁻¹
mPoCIRE04	AJ972488	5' TCGCTATGACTAACATTGTC 3' 5' ATGGACACCGTAAAGAAC 3'*	(TG) ₈	310–328	54 °C	7	138	0.45	0.19	1.10 ⁻⁴
mPoCIRF08	AJ972489	5' ACCAAATTGCTGTAGAATGAC 3' 5' ATCCGAAGATATTCACCTTAC 3'*	(TG) ₁₈ (AG) ₂₂	154–228	54 °C	20	140	0.84	0.56	1.10 ⁻⁴
mPoCIRH02	AJ972490	5' GCATCAATCCGAATGAGG 3' 5' TTGAGGGGTTGTAAGG 3'*	(CA) ₃₈	307–323	54 °C	5	26	0.57	0.31	1.10 ⁻³
mPoCIRE09	AJ972491	5' ACCGTGTCTCGGATTCTGTC 3' 5' TATCCTTGACATGCCCTTGAG 3'*	(CA) ₁₃	274–288	54 °C	8	155	0.64	0.33	1.10 ⁻⁵
mPoCIRH08	AJ972492	5' GTAAGCAGTTCTCTATTCTCTCTC 3' 5' CAACCGATCACTCAACC 3'*	(TC) ₁₇ (AC) ₉	227–251	54 °C	7	158	0.3	0.18	1.10 ⁻⁵
mPoCIRH07	AJ972494	5' CACATCAAATCATCAAATATACCC 3' 5' GACAAGAAAACAGAAAGC 3'*	(CA) ₁₃	243–260	54 °C	4	62	0.59	0.22	1.10 ⁻³
mPoCIRF03	AJ972493	5' CTCCAGACAAACCAAGGATC 3' 5' GGAAAGAACCATCAAATGC 3'*	(CA) ₁₆ (TA) ₇	125–159	54 °C	14	162	0.69	0.50	1.10 ⁻⁵

* 5' fluorescent-labelled primer:
CACGACGTTGTAAACGAC

n, number of individuals; H_E , expected heterozygosity under Hardy–Weinberg equilibrium; H_O , observed heterozygosity; No., number of alleles; P values for the Hardy–Weinberg Equilibrium test, significance threshold adjusted using sequential Bonferroni correction: $P < 0.003$.

according to the Billote *et al.* (1999) protocol. A total of 42 clones were selected and sequenced using BigDye Terminator Cycle Sequencing chemistry (Applied Biosystems). Thirty-two of the sequenced clones contained a microsatellite region with at least four uninterrupted repeats. After discarding duplicates, hybrid clones and clones with the microsatellite region too close to the edge of the sequence, 16 sequences were found suitable for primer design and allowed a successful design using OLIGO EXPLORER software 1.1.0 (Teemu Kuulasma, 2000–2002; www.genelink.com), and were then tested for polymerase chain reaction (PCR) and polymorphism assessment. Eight loci were finally useful for our study, showing specific and polymorphic amplicons: mPoCIRE01, mPoCIRE04, mPoCIRF08, mPoCIRH02, mPoCIRE09, mPoCIRH08, mPoCIRF03 and mPoCIRH07 (Table 1).

PCR amplifications were performed using 10 µL total reaction volumes with 1 × Taq buffer (10 mM Tris, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3; Roche), 200 µmol dNTP, 0.5 mmol each of forward and reverse primers, 0.1 µmol M13 IRD-labelled primer, 1 U Taq DNA polymerase and between 10 and 30 ng of genomic DNA template. The amplifications were carried out with a Robocycler gradient 96 (Stratagene) thermal cycler under the following conditions: an initial 4 min denaturation step at 94 °C followed by 36 cycles consisting in 30 s at 92 °C, 1 min at 54 °C, 45 s at 72 °C and a final extension step at 72 °C for 5 min. Following amplification, 3 µL of loading dye (100% formamide) was added

to each reaction. For final screening, the microsatellites were detected on a LI-COR 4200 sequencer with a 7% polyacrylamide (Long Ranger) gels.

The number of alleles found ranged from four to 20 per locus and was substantially higher in the continent than in the Islands. Microsatellite genotypes were tested for linkage disequilibria for all pairs of loci within each population using Fisher's exact test. Unbiased exact P value estimates were obtained by the Markov chain method computed by GENEPOL (Raymond & Rousset 1995) with 5000 permutations, and significance was adjusted using the Bonferroni correction. Loci were at linkage equilibrium in all of the populations we studied.

Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were detected for all loci using GENEPOL software. In all cases, the observed frequency of heterozygotes was lower than the expected frequency (P values < 0.003 , significance threshold adjusted with the Bonferroni procedure (Rice 1989)) (Table 1). The use of MICRO-CHECKER software (Van Oosterhout *et al.* 2004) suggested the presence of null alleles in the total population, which could explain this deviation from Hardy–Weinberg equilibrium. However, this could be interpreted as the result of a Wahlund effect because the populations were structured in several subpopulations. Actually, most of the loci tend to have heterozygote deficits, which speak for a demographic effect. These loci provide the first set of microsatellite markers derived directly from the *P. officinalis* Jacq. genome.

Acknowledgements

We thank Ministère de L'Ecologie et du Développement Durable (grant n°020000118) for their financial support and the region Guadeloupe fellowship to F. Muller. We are grateful to C. Leroux, G. Bena, A. Rousseau and M. Poitel for their contribution during the sampling, and sequencing activities.

References

- Billote N, Lagoda PJL, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forestry Research*, **20**, 254–257.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 3.2a): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Rivera-Ocasio E, Aide TM, McMillan WO (2002) Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Molecular Ecology*, **11**, 675–683.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.

Chapitre 2 : Diversité génétique et phylogéographie chez *Pterocarpus officinalis* Jacq dans la région Caraïbe

Introduction à publication 2

On s'attend à ce que l'incidence de certaines forces évolutives sur les systèmes insulaires diffère, par rapport à ce qui est observé dans les milieux continentaux. Leurs structures géographiques (taille), leur isolement et leur histoire géologique peuvent amener les îles à présenter des spécificités en termes de diversité, ainsi qu'une forte différenciation entre elles. À ces particularités inhérentes à l'insularité, les populations naturelles doivent faire face à des pressions croissantes d'origine anthropique, dont la réduction des aires de répartition en taille et en nombre, pouvant de toute évidence influencer leur structure et leur diversité génétique. *P. officinalis* dont certaines populations insulaires se limitent maintenant à des enclaves de quelques individus, n'échappe pas à ce phénomène.

Les informations différentes et complémentaires apportées par les marqueurs microsatellites nucléaire et chloroplastique, et leur pertinence dans le cadre de notre étude, nous ont conduit à estimer la diversité génétique chez *P. officinalis* par la double approche de ces deux types de marqueurs. Nous avons cherché à évaluer les flux de gènes, la différenciation et la structuration génétique des populations, ainsi que de l'impact de l'insularité et des actions anthropiques sur la diversité. Suite à l'analyse des résultats nous ayant permis de mieux appréhender l'état et la structuration génétique des populations de *P. officinalis*, il nous a paru primordial de s'interroger sur la nécessité d'un programme de conservation. Le but d'un tel programme étant de nous permettre de déterminer les aires de répartition à protéger en priorité, mais aussi de préserver la diversité génétique, et donc améliorer les chances de survie de l'espèce.

Manuscrit II

Pattern of genetic diversity of an insular tree species, *Pterocarpus officinalis* Jacq., distributed in Caribbean zones : implication for its conservation

.

MULLER Félix, VOCCIA Marie, BÂ Amadou and BOUVET Jean-Marc (2006) soumis en juillet 2006 dans « Conservation Genetics »

Pattern of genetic diversity of *Pterocarpus officinalis* Jacq., a tree species distributed in Caribbean zones : implication for its conservation in islands.

MULLER Félix^{1,2,3}, VOCCIA Marie¹, BÂ Amadou² and BOUVET Jean-Marc^{1*}

¹ CIRAD, Forest Department, research unit "genetic diversity and breeding of forest tree species" Campus international de Baillarguet TA 10/C 34398 Montpellier cédex 5 France

² Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles et de la Guyane, BP. 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.

³Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 1063 IRD/INRA/CIRAD/ENSA-M/UM2, campus international de Baillarguet, TA 10/J, 34398 Montpellier cedex 55, France.

* Author for correspondence

BOUVET Jean-Marc, CIRAD, Forest Department, research unit "genetic diversity and breeding of forest tree species" Campus international de Baillarguet TA 10/C 34398 Montpellier cédex 5 France

Fax number: +33 4 67 59 37 33; Tel +33 4 67 59 38 81 E-mail:jean-marc.bouvet@cirad.fr

Running title : conservation of a Caribbean tree

Abstract

Patterns of genetic variation are critical to define strategy of conservation of threatened species especially in island ecosystems. We analysed the molecular diversity of *Pterocarpus officinalis*, a tree species distributed in Caribbean islands and South and Central America.

Leaves from 202 individuals of 9 populations dispersed on 5 different islands in the Caribbean and one population of the South American continent were collected and analysed using chloroplast and nuclear microsatellite markers. Based on the combination of three universal chloroplast probes, ten individual chlorotypes were identified. Six nuclear microsatellite loci were used.

The diversity parameters varied markedly among the populations for nuclear and microsatellites, ($H_{Onuc}=0.20 - 0.50$; $H_{cp}=0.22 - 0.68$). Island populations showed lower values than continental populations, which was expected in the case of species distributed in small isolated islands. The fixation index ranged

from $F_{is} = -0.043$ to $F_{is} = 0.368$; except for two populations, a significant heterozygote deficit was detected in other populations. Global and pairwise F_{st} were high for both chloroplast and nuclear microsatellites, $F_{stcp}= 0.58$ and $F_{stnuc}= 0.29$ respectively, resulting in a low number of migrant per generation.

The distribution of chlorotypes, and the neighbour-joining tree based on both markers, presented a differentiation pattern that can be explained by the mode of seed dispersal by flotation. Management units for conservation of islands populations can be defined on the basis of differentiation through molecular markers. Due to the limited gene flow one management unit per island can be proposed. Urgent measures such as replanting are needed to reduce the risk of extinction in some islands.

Keywords: insularity, *Pterocarpus officinalis* Jacq., nuclear microsatellites, chloroplast microsatellites, genetic diversity, genetic structure

Introduction

Due to their isolated status, small size, and the small numbers of colonisers, islands exacerbate the effect of genetic drift, the effect of inbreeding depression and the differentiation between the populations within species (Barett 1996). Experimental results have confirmed the theoretical models and have indicated that differentiation between island populations is high and that islands contain less genetic variation (Frankham 1996). These genetic diversity patterns amplify the risk of extinction when a plant is threatened by overexploitation or other human activities (Frankham, 2002).

Although they represent an important component of the ecosystem and play a significant role in economic and environmental issues of islands, numerous insular tree species undergo many threats due to overexploitation (Butaud *et al.* 2005), reduction of the original forest ecosystem and the negative impact of invasive species (Tassin 1999).

This is the case of *Pterocarpus officinalis* Jacq. (Leguminosae), one of the most important freshwater wetland tree species in the Caribbean (Bacon 1990). It covers large areas of the coastal floodplain and individual trees and small stands occur along rivers and in the Luquillo Mountains (Cintrón 1983). During the last two centuries, the distribution of *P. officinalis* was greatly reduced in Caribbean islands when coastal plain forests were cut and drained for agriculture and urbanisation. Today, most of the populations of *P. officinalis* are restricted in areas adjacent to mangroves where changes in hydrology could affect the survivorship of these stands.

Several complementary approaches can be developed to investigate the risk of extinction of a species and provide recommendation for its conservation. One way consists in investigating the genetic variation within tree species using molecular markers with neutral effects. They clarify the impact of evolutionary forces such as drift and migration, and provide basic information on the biology of the species.

In this study we combined nuclear and chloroplast microsatellite markers. Nuclear microsatellite markers are one of the most popular DNA-based approaches. They are co-dominant and among the less technically demanding and offer a fast method of providing information from variable loci, which is particularly efficient in species where genetic diversity is expected to be low. There are some limitations, however, owing to their size homoplasy (Navascués & Emerson 2005; Estoup *et al.* 2002).

Chloroplast microsatellite markers have received much attention and are used in phylogeographic studies. For example, they have been utilised for gymnosperm (Marshall *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2003) and angiosperm tree species (Palme & Vendramin 2002; Collevatti *et al.* 2003; Grivet & Petit 2003). They exhibit a relative slow rate of sequence evolution and the absence of recombination makes this marker suitable for historical studies. They are maternally inherited in most angiosperms and disseminated by seeds, so the level of differentiation is greater than with bi-parental inheritance. They are then best suited to assess the impact of historical factors on current genetic diversity because the seeds of most angiosperm tree species are dispersed over shorter distances than pollen.

Although molecular techniques have been widely used in tree species, few studies have combined both markers to study pattern of genetic diversity in insular system. This combination should provide useful information to implement a strategy of conservation and restoration of populations in these islands.

The aims of our complementary approaches were then (i) to quantify the genetic variation within and between populations using both co-dominant nuclear and cytoplasmic markers, (ii) to analyse the geographic distribution of diversity in the natural range to infer population differentiation (iii) to provide genetic data to implement conservation strategy.

Table 1: Co-ordinates, sample size (N) and main characteristics of the populations of *Pterocarpus officinalis*

Country	Island name	Population name	Lat. (N)	Long.(W)	N	Characteristics
Guadeloupe (France)	Grande terre	Belle Plaine	16°20'	61°32'	36	Several hundred trees in a monospecific stand of 5 ha
	Basse terre	Deshaines	16°18'	61°48	20	very small population (20 residual trees)
	Grande Terre	Le moule	16°20'	61°21'	20	very small population (50 dispersed trees)
	Marie Galante	Bois de Folle-Anse	15°56'	61°18'	20	edge of river (several hundred trees)
Dominican Republic	Dominica	Indian River	15°34'	61°28'	20	edge of river (30 residual trees)
Martinique (France)	Martinique	le Galion	14°45'	60°55'	20	last Martinique population (one hundred residual trees)
Puerto Rico	Puerto Rico	EI Yunque	18°19'	65°47'	13	Mountain population altitude 400 m
	Puerto Rico	Sabana Seca	18°28'	66°22'	20	Coastal population of 12 ha
French Guyana (France)	-	la Crique Alexandre	5°24'	52°58'	33	small population along the affluent of the Sinnamary river

Methods

Species features

Pterocarpus officinalis (Fabaceae) grows throughout the Neotropics from 20°N to 2°S in latitude. It is one of the dominant tree species in fresh and brackish water wetlands throughout the Caribbean, and coastal areas of central and northern South America (imbert et al. 2000). The tree can reach 25 m tall with a diameter at breast height around 0.5 metres. The species grows in monospecific stands with adult tree densities reaching 200 individual trees ha⁻¹. It is characterized by a narrow buttress, compound and alternate leaves, yellow bee-pollinated flowers and bloodred sap (Rivera-Ocasio et al. 2002; Little & Wadsworth 1964). Seeds are disseminated by flotation and are still able to germinate after several weeks in sea water (Lopez 2001; Rivera-Ocasio et al. 2002).

Plant material

Leaves from 202 individuals of 9 populations dispersed over five different islands in the Caribbean and one on the South American continent were collected between March 2003 and September 2003. On each island, populations were defined as the set of individuals exchanging genes without any geographical disruption. The number of populations varied from one island to another. Populations were generally small and scattered on each island, except for Belle Plaine, which has numerous individual trees in a large area.

Sampling was, however, very unbalanced, the number of individuals per island varying from 13 (Puerto Rico) to 33 (Belle Plaine) (Table 1). The objective was to sample a minimum of 20 individuals per population. Five leaves were collected from each tree and immediately dried using silica gel. Where the size of the population was sufficient, we selected trees separated by more than 10 m to avoid selection of the same clone (assuming that resprouting by root suckers can create patches of the same clone).

DNA extraction

DNA was extracted from dried leaves following the modified protocol described by Bousquet et al. (1990). Leaves (100 mg) were ground to a fine powder with a mortar and pestle under liquid nitrogen. DNA-extraction buffer (5 mL) was added (100 mM Tris-HCl pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 2% mixed alkyl trimethyl ammonium bromide (MATAB); 1% polyethylene glycol (PEG) 6000) and the mixture was transferred to 13-mL sterile tubes.

The tubes were then incubated at 65°C for 30 min. Samples were washed with wet chloroform (chloroform: isoamyl alcohol, 24: 1) to remove cellular debris and protein. After 15-min centrifugation at 4500 g, the liquid phase was transferred to new 13-mL tubes. Samples were again washed and centrifuged and the liquid phase was transferred to new 13-mL tubes. Sodium acetate (pH 5, 3 M, 450 µL) and isopropanol (5 mL) were added and mixed gently before putting the sample in the deep freeze for 15 min 20 °C) to precipitate the DNA. Then, after 5 min centrifugation at 4500 g, the isopropanol was eliminated. The resulting DNA pellets were washed with 70% ethanol (1 mL), transferred to 1.5-mL Eppendorf tubes, and centrifuged for 5 min at 1900 g. After elimination of the ethanol, the pellet was dried and resuspended in 200 µL sterile water for 20 min at 37 °C. Samples were stored at -20 °C until required.

Chloroplast microsatellite method

Seven universal microsatellite primers (Ccmp) described by Weising & Gardner (1999), and 33 solanaceous microsatellites (Ntcp) described by Bryan et al. (1999), were tested over a subset of the population. Among the 40 primer pairs tested on a sample of eight individuals, three were polymorphic (Ccmp3, Ccmp7 and Ntcp8). For the Ccmp primers, PCR amplifications were carried out in a 10 µL reaction mix, with 2 µL DNA (1 ng/µL), 5

Table 2: Diversity parameter assessed with nuclear and chloroplast microsatellite markers in the population of *P. officinalis*.

N number of individuals; na, number of alleles per locus; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; F_{is} , fixation index; R , corrected allelic richness. P values: ns; $P > 0.05^*$; $P < 0.05^{**}$; $P < 0.01^{***}$; $P < 0.001$ (P values were adjusted using the sequential Bonferroni procedure, Rice (1989))

Island / Country	Population	Nuclear Microsatellites						Chloroplast Microsatellites			
		N_{nuc}	na_{nuc}	R_{nuc}	$H_o_{nuc} (SD)$	$H_e_{nuc} (SD)$	F_{is}	N_{cp}	na_{cp}	ne_{cp}	$H_{cp} (SD)$
Guadeloupe	Belle Plaine	36	4.50	3.02	0.44 (0.23)	0.49 (0.28)	0.110**	28	4	2.56	0.63 (0.06)
Guadeloupe	Deshaises	20	2.50	2.2	0.38 (0.32)	0.38 (0.31)	0.025 ns	15	3	2.06	0.36 (0.14)
Guadeloupe	Le moule	20	2.83	2.63	0.36 (0.20)	0.45 (0.24)	0.249**	9	2	1.25	0.22 (0.17)
Marie Galante	Bois de Folle Anse	20	2.50	2	0.36 (0.20)	0.24 (0.21)	0.217**	16	3	2.25	0.36 (0.07)
Dominica	Indian River	20	3.33	2.58	0.25 (0.22)	0.38 (0.23)	0.368***	18	3	2.79	0.68 (0.06)
Martinique	le Galion	20	4.17	3.02	0.42 (0.34)	0.39 (0.27)	-0.043 ns	10	3	1.52	0.38 (0.18)
Puerto Rico	El Yunque	13	1.67	1.64	0.20 (0.28)	0.26 (0.24)	0.307**	-	-	-	-
Puerto Rico	Sabana Seca la crique	20	3.17	2.58	0.47 (0.19)	0.46 (0.12)	0.038*	12	2	1.95	0.53 (0.08)
French Guyana	Alexandre	33	5.33	4.12	0.50 (0.22)	0.59 (0.24)	0.173***	8	3	1.68	0.46 (0.20)
Total		202	9.67	-	0.36 (0.17)	0.57 (0.21)	0.36***	116	10	3.67	0.63 (0.07)

μL 2·X buffer, 0.5 μM of each primer (R and F), and 0.1 U/ μL polymerase DNA Taq, completed with sterile water. All reactions were performed in a 6 Stratagene Thermocycler. Optimal amplification conditions were 1 cycle of 5 min at 94 °C (initial denaturation), followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C (denaturation), 1 min at 56 °C (annealing), and 1 min at 72 °C (extension) and a final step of 8 min at 72 °C ensured full extension of all amplified products. For the Ntcp primers, PCR amplifications were carried out in a 10 μL reaction mix with 2 μL DNA (1 ng/ μL), 5 μL 2X-buffer, 0.2 μM of each primer (R and F), and 0.025 U/ μL polymerase DNA Taq, completed with sterile water. All reactions were performed in a Stratagene Thermocycler. Optimal amplification conditions were 1 cycle of 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 45 s at 92 °C, 45 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C, and a final step of 8 min at 72 °C. Bands were separated and visualized in acrylamide gel.

Nuclear microsatellite method

The genetic analysis was done using six nuclear microsatellites: *mPoCIRE01*, *mPoCIRH08*, *mPoCIRE09*, *mPoCIRF03*, *mPoCIRF08*, and *mPoCIRE04*, designed specifically for *Pterocarpus officinalis* Jacq. Their characteristics and the methods used to obtain them are described elsewhere (Muller *et al.* 2006).

Data analysis

For nuclear microsatellite studies, the allele frequencies, the number of alleles per locus ($n_{\text{a,nuc}}$), observed heterozygosity ($H_{\text{O,nuc}}$) and expected heterozygosity ($H_{\text{E,nuc}}$) (Nei 1978), and the fixation index (F_{is}), per population were computed using Genetix 4.03 (Belkhir *et al.* 2001).

To check if diversity estimates were affected by the differences in sample sizes and the various spatial scales over which individuals were pooled into ‘populations’, we calculated the allelic richness per population and island taking into account

the dependence on sample size with an adaptation of the rarefaction index of Hurlbert (1971) (El Mousadik & Petit 1996), named ‘ R ’, using Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2001). The principle is to estimate the expected number of alleles in a sub-sample of $2n$ genes, given that $2N$ genes have been sampled ($N > n$). In Fstat, n is fixed as the smallest number of individuals typed for a locus in a sample. The pairwise $F_{\text{st,nuc}}$ was calculated among the 9 populations by Fstat (Goudet *et al.* 2002). Testing for population differentiation was conducted by bootstrapping, and probability values were determined per 1000 permutations according to the approach described by Excoffier *et al.* (1992) and compared to the P value adjusted by the sequential Bonferroni procedure (Rice 1989).

To explain the departure from Hardy-Weinberg equilibrium and to detect the number of sub-populations within a group of genotypes, we used the method developed by Guillot *et al.* (2005a) and the Geneland package (Guillot *et al.* 2005b). This approach used a Bayesian model implemented in a Markov chain Monte Carlo scheme which allows inference of the location of genetic discontinuities from individual georeferenced multilocus genotypes, without a priori knowledge on population units and limits (Guillot *et al.* 2005). The main assumptions of the methods are : (i) the number of population is unknown and all value are considered a priori equally (ii)populations are spread over areas given by the union of some polygons of unknown location in the spatial domain (iii) Hardy-Weinberg equilibrium is assumed within each population and (iv) allele frequency in each population are unknown and treated as random variable following the so-called Dirichlet model or Falush model.

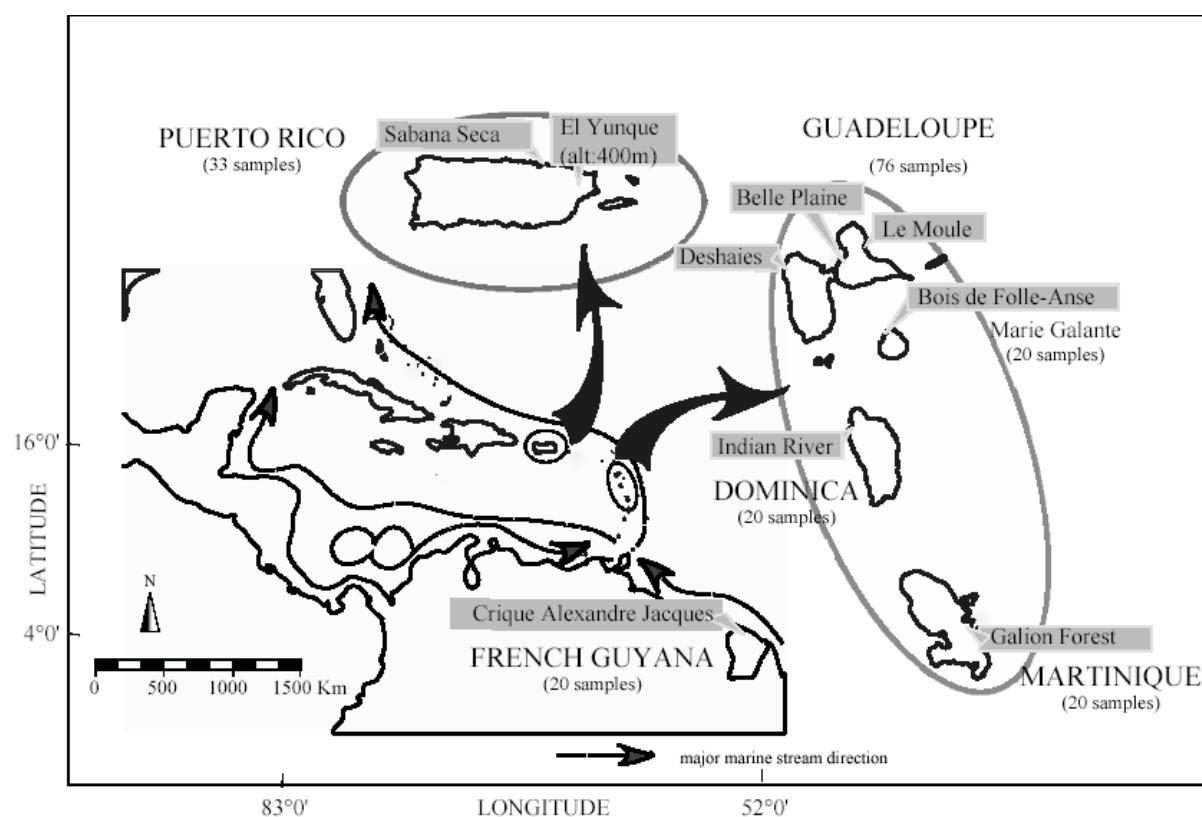
A chlorotype is defined as a combination of the different alleles established at each locus. Because of the non-recombinant nature of the chloroplast genome, cpDNA chlorotypes were then treated as alleles at a single locus. Chlorotype diversity and genetic structure parameters were calculated using Arlequin software version 2000 (Schneider *et al.* 2000). The gene

Table 3: Frequencies of chlorotypes in the total population of *Pterocarpus officinalis* Jacq., allelic characteristics in base pairs for the three loci, and allelic combination corresponding to each chlorotype

Chlorotype	Chlorotype frequency	allele description in		
		CCMP %	CCMP 3	NTCP 7
			8	
A	16,38	95	154	244
B	2,59	97	156	244
C	23,28	97	156	248
D	20,69	96	154	245
E	0,86	95	153	244
F	25,00	96	153	245
G	0,86	96	153	244
H	8,62	96	155	245
I	0,86	96	152	245
J	0,86	97	156	245

Fig. 1: Main occurrence of *Pterocarpus officinalis* in the region and location of the populations analysed in the study.

The directions of the main marine currents are represented by arrows (according to Rivera-Ocasio (2002) and <http://bulletin.mercator->).



diversity index H_{cp} was calculated using the Nei formula (Nei 1987). The number of chlorotypes (na_{cp}) and the effective chlorotype number (ne_{cp}) were calculated for each population. The genetic structure was estimated using analysis of molecular variance, AMOVA (Excoffier et al. 1992). The pairwise F_{st} was calculated among the 9 populations. The test for population differentiation was conducted as for nuclear markers.

The number of migrants per generation was calculated using the classical formula:

$$Nm = \frac{1 - F_{st}}{4F_{st} \frac{n}{n-1}}$$

where n is the sample size (Slatkin and Barton, 1989).

For both markers (nuclear and chloroplast), the genetic structure illustrated by a cluster analysis using the neighbour-joining method and Phylip 6.1 software (Felsenstein 1993). The matrix of genetic distances was calculated using the Cavalli-Sforza distance D2 (Cavalli-Sforza & Edwards 1967), which is adapted to describe the structure of populations according to their evolutionary history. The spatial pattern of distribution of genetic diversity was studied by means of a Mantel test which was used to estimate the correlation between the matrix of geographical distances between populations and that of the genetic distances estimated by pairwise F_{st} .

Results

Within-population diversity

The six nuclear microsatellite loci were all polymorphic and the number of alleles per locus ranged from 4 for *mPoCIRE01* to 20 for *mPoCIRF08*. Mean number of alleles per locus per population ranged from $na_{nuc}=1.67$ in the El Yunque location on the Puerto Rico island (allelic richness in this population $R=2.58$) to $na_{nuc}=5.33$ in la Crique Alexandre Jacques in French Guyana ($R=4.12$) (Table 2). Observed and expected (in parenthesis) heterozygosity values ranged from $Ho_{nuc}=0.2$ ($He_{nuc}=0.26$) in El Yunque to $Ho_{nuc}=0.50$ ($He_{nuc}=0.59$) in

la Crique Alexandre Jacques. The ranking of population for na_{nuc} and Ho_{nuc} was similar but differed with the allelic richness R. The fixation index F_{is} varied among populations, ranging from $F_{is}=-0.043$ in Le Galion to $F_{is}=0.368$ in the Indian River site on the Dominican Island. Except for Deshaies and Le Galion, a significant heterozygote deficit was detected in each population (Table 2)

Among the 202 individuals genotyped with chloroplast microsatellites, 116 provided a chlorotype with three primers, and the other individuals were eliminated due to the absence of amplification for one of the three primers. Using two primers, the number of individuals presenting a chlorotype was higher, but we chose to conduct the analysis with chlorotypes defined by three primers to get a better accuracy of the genetic relationship between populations and to reduce the effect of homoplasy (Navascues & Emerson 2005).

Based on the combination of these three universal chloroplast probes, ten individual chlorotypes could be identified (Table 3). Four of these chlorotypes (A, C, D and F) were more widespread than the six others. The frequencies of the four widespread chlorotypes ranged between 0.25 and 0.16, whereas the frequency of the remaining chlorotypes varied between 0.03 and 0.09 (Table 3). The two more prevalent chlorotypes, F and D, were found in 5 and 6 of the 9 studied populations, respectively. The diversity parameters varied markedly among the populations (Table 3), the least variable population being Le Moule in Guadeloupe island ($H_{cp}=0.22$) and the most variable being Indian River in the Dominican Republic ($H_{cp}=0.68$). A similar pattern was observed for na_{cp} but not ne_{cp} , this parameter being affected by the distribution of chlorotype frequency. The variation among populations was correlated with sample size, the least variable populations having the smallest number of individuals.

Fig. 2: Unrooted neighbour-joining tree of (a) nuclear microsatellites and (b) chloroplast microsatellites drawn with Phylogenetic 6.1 (Felsenstein, 1993) with the matrix of genetic distances calculated using the Cavalli-Sforza distance (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). Bootstrap values are presented at the base of branches.

Fig. 2a:

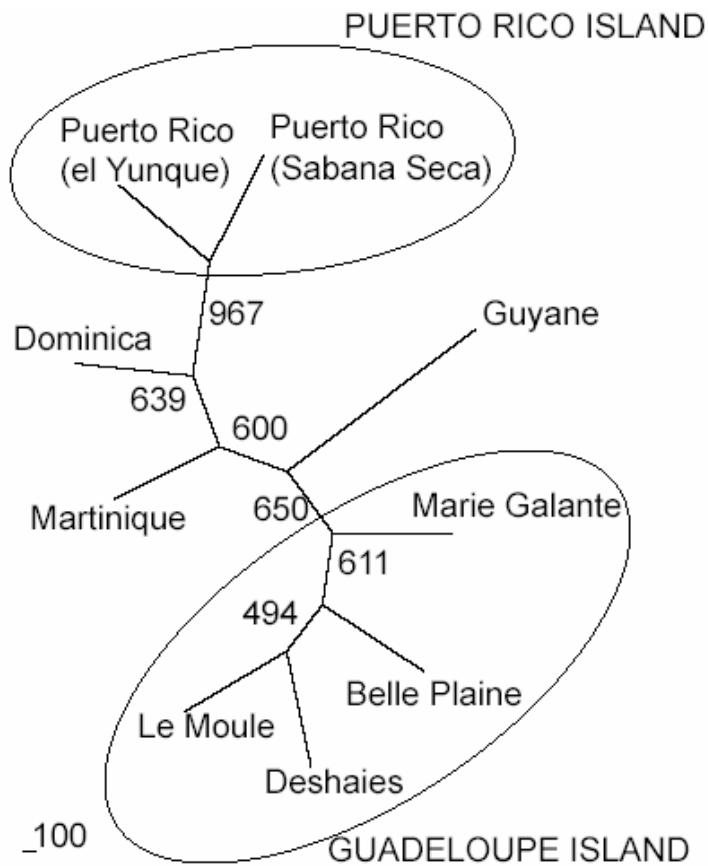
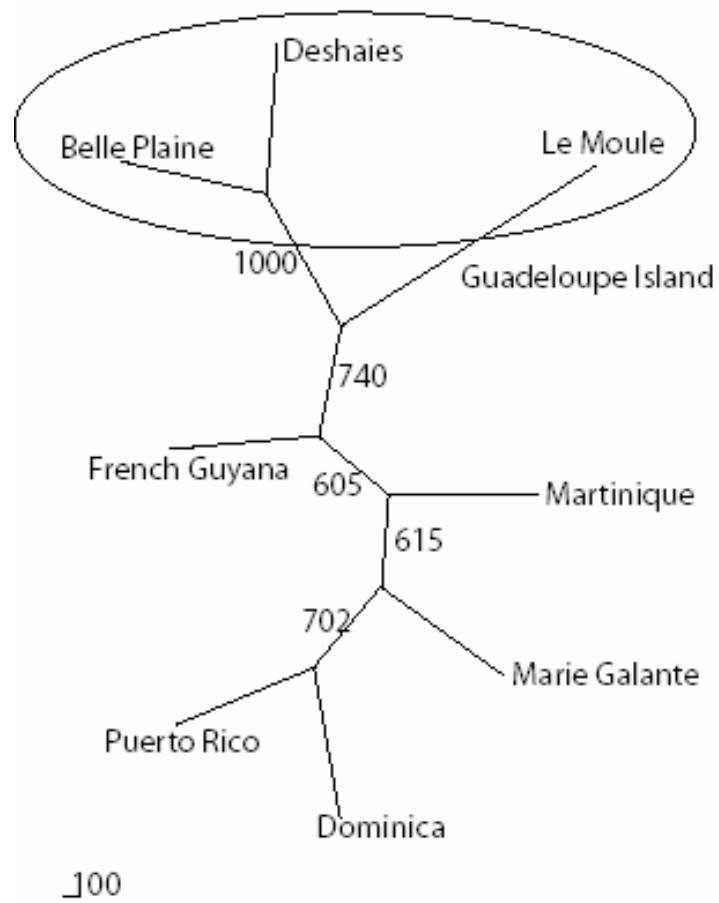


Fig. 2b:



Differentiation between populations

The Value of F_{stnuc} calculated with nuclear microsatellites showed a marked differentiation between populations ($F_{stnuc}=0.29$, $P<0.0001$). The pairwise F_{stnuc} were significantly different from zero except between the two populations located in the East of Guadeloupe island (Le Moule and Belle Plaine, Fig.1) and the two populations from Puerto Rico (El Yunque and Sabana Seca, Fig.1) (Table 4). In terms of migrants the results showed that among 36 Nm, 23 are smaller than one, 12 are smaller than two and one is higher than ten (case of populations of east of Guadeloupe). This differentiation was illustrated by the neighbour-joining tree (Fig 2a) which showed bootstrap values higher than 500 and clearly separated the cluster of the Guadeloupe archipelago and the cluster of the Puerto Rico populations. Surprisingly, the population of French Guyana was located between these two clusters although it is geographically very distant. The scattered points between the genetic (pairwise F_{stnuc}) and geographic distances did not present a linear relationship (Fig. 3a) and the associated Mantel test confirmed this observation, confirming a non-significant coefficient of correlation ($r=-0.213$, $P=0.668$).

The differentiation index assessed with the chloroplast microsatellites including all the populations exhibited a high value too ($F_{stcp} = 0.58$, $P<0.0001$). The pairwise F_{stcp} were all significant except between the three pairs of populations (Puerto Rico/Dominica, Puerto Rico/Marie-Galante and Marie Galante/Dominica, Fig.1) (Table 4). This resulted in three values of Nm higher than one among 28. The neighbour-joining tree showed a more complex pattern than for the nuclear microsatellites (Fig. 2b); the populations from the Guadeloupe archipelago were distributed in two clusters, one close to Puerto Rico populations, the other one close to Dominica. The French Guyana population was still found between the cluster of Guadeloupe and the cluster comprising Martinique, Dominica, Marie Galante and Puerto Rico. Figure 3b does not illustrate a linear relationship between

genetic and geographic distances, like the nuclear microsatellites. This absence of linear correlation was confirmed by the Mantel test which indicated a non-significant correlation between genetic and geographic distances ($r=0.026$, $P=0.26$). The distribution of the 10 haplotypes across the natural range showed a complex pattern (Figure 4a). Haplotypes C, D and H were scattered among distant populations (C, D and H were present in French Guyana, and in the islands from Martinique up to Puerto Rico), whereas some others such as haplotypes E and I were restricted to a single population.

Discussion

Within-population diversity

The expected heterozygosity parameters assessed with nuclear microsatellites in this study were among the smallest compared to other studies using the same marker (Table 5). Our estimates are close to values of species distributed in small islands such as *Santalum austrocaledonicum* and *Santalum insulare* (Table 6).

The results obtained with *P. officinalis* confirm some theoretical models related to the pattern of diversity in islands. Expected heterozygosity shows a higher value in the population of French Guyana ($He_{nuc}=0.59$), the highest He for an island population being the population of Belle Plaine ($He_{nuc}=0.49$). This difference was more pronounced when the allelic richness R_{nuc} , which takes into account the sample size, was used to make the comparison ($R_{nuc}=4.12$ in French Guyana and $R_{nuc}=3.02$ in Belle Plaine). Although the differences are smaller than the standard deviation, they suggest that within-population diversity is higher in the mainland population than in the island population. These results confirm the first analysis on *P. officinalis* using AFLP: this study showed that the diversity was lower in the islands (Puerto Rico, Dominican Republic, Guadeloupe and Trinidad) than in four populations of the continent (Venezuela, Costa Rica, Panama and Darien region) (Rivera-Ocasio *et al.* 2002).

Fig. 3: Relationship between genetic and geographical distances among populations of *Pterocarpus officinalis* Jacq.. Matrices of genetic distances were calculated using pairwise (a) nuclear Fst and (b) chloroplast Fst (Arlequin ver. 2000).

Fig. 3a:

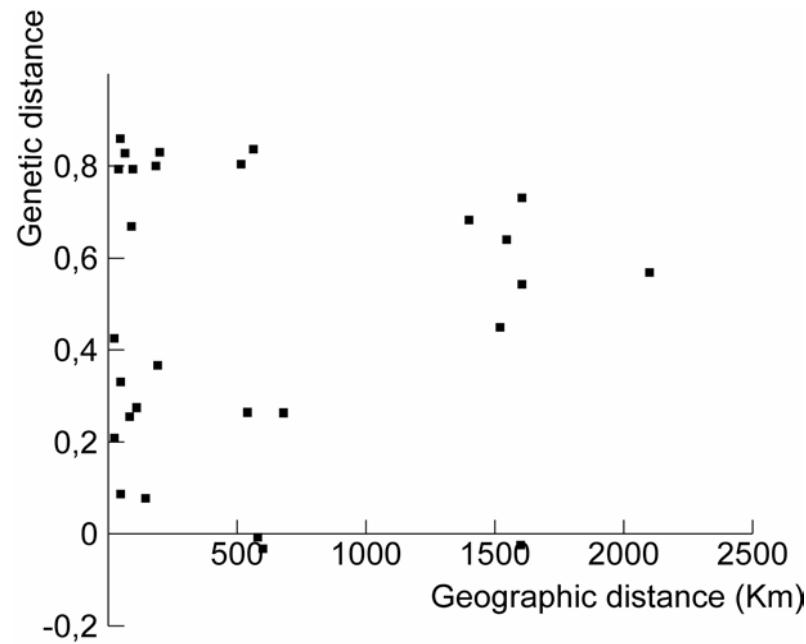
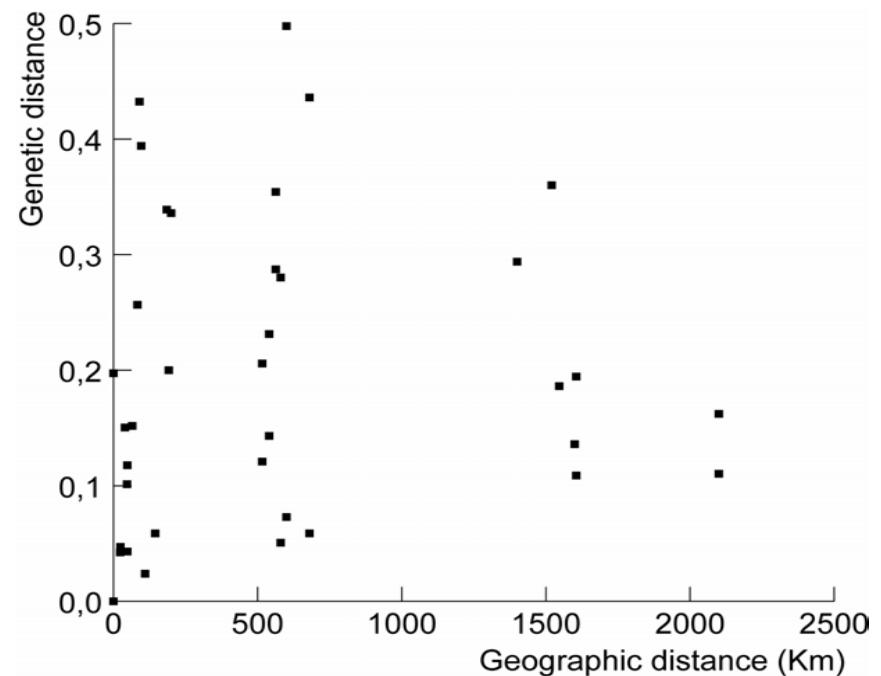


Fig. 3b:



They also confirm previous general results obtained by comparing the diversity parameters of various organisms for island and mainland populations (Frankham 1996). Oceanic islands are expected to lose genetic variation at foundation and after foundation as these populations have lower population sizes than mainland populations. In addition, populations in most of the Caribbean islands have undergone marked reduction due to human activities thereby contributing to the reduction of diversity (Rivera-Ocasio et al. 2002; Imbert et al., 1988).

Fixation index

Except for two populations, our study reveals a strong heterozygote deficit with significant F_{is} values ranging from $F_{is}=0.173$ ($P<0.0001$) to $F_{is}=0.368$ ($P<0.0001$). This result is similar to that found in other forest tree species present in small islands (Bottin et al. 2005). There are various possible explanations for this deficit.

The first is the presence of null alleles which can be addressed by the analysis of missing data. The percentage of missing data was especially high for some loci, suggesting that null alleles may be present (the percentage of missing data per locus is as follows mPoCIRE01: 4.5%; mPoCIRH08: 5.1%; mPoCIRE09: 3.2%; mPoCIRF03: 8.3%; mPoCIRF08: 12.1%; mPoCIRE04: 14%). However the estimation of F_{is} using loci with a very low percentage of missing data (mPoCIRE01, mPoCIRH08 and mPoCIRE09) gave very similar results. Additionally, these three suspicious loci (mPoCIRF03, mPoCIRF08 and mPoCIRE04) did not give systematically positive and very high values of F_{is} for each locus, suggesting that the missing data do not result from a null allele effect.

The second explanation is the Wahlund effect which occurs when a spatial or temporal structure exists in the sampled population. The presence of the Wahlund effect may not be the most relevant explanation because the size of each population was very small in each location and no sub-population included in the total population was noticed during sampling. In

addition, the sampled individual trees belong to the same adult cohort and no temporal sub-structure was observed during the collection of leaves. This observation was confirmed by the result of the method develop by Guillot et al., (2005a, 2005b). No sub-populations were detected within each population showing a positive F_{is} .

The third explanation is the mating system of trees; selfing can increase the rate of homozygosity in the population. Selfing is favoured by a low density of trees within a population and a lack of pollinators. Tree density was generally high in most of the populations, thus facilitating the exchange of pollen, and does not seem to be the most relevant explanation. However, in some populations such as Belle Plaine in Guadeloupe, abundant flowering within the same tree was observed, which will facilitate self-pollination.

The fourth explanation is that the high positive F_{is} results from the finite population size. The small number of individuals at foundation and the small population size facilitate crossing between relatives and increase inbreeding. This theoretical principle was empirically confirmed by Frankham (1998), who found higher values of F_{is} in endemic island species compared to the mainland. Our results show, however, that the population in French Guyana presents a positive and significant F_{is} which is in contradiction with Frankham's analysis. This is explained by the distribution of individuals along the river edges and the isolated status of this population in French Guyana

Patterns of differentiation

Because *P. officinalis* is distributed in a fragmented range, the F_{stnuc} estimated using nuclear microsatellites is expected to be higher than in species distributed in continuous range. This result was confirmed by the comparison with F_{struc} assessed for continental tree species with a continuous range. Table 5 shows smaller differentiation indices, but similar F_{stnuc} are observed in other insular species such as *Santalum austrocaledonicum* and *S. insulare*. This pattern is not verified when the differentiation is assessed using

Table 4: pairwise F_{ST} with nuclear (above diagonal) and chloroplast (under diagonal) microsatellites. All the F_{ST} are significantly different from zero with a P values < 0.001 except those with the ns mention.

Fst	Guadeloupe Belle Plaine	Guadeloupe Deshaies	Guadeloupe Le moule	Marie Galante Bois de F Anse	Dominica	Martinique	Puerto Rico El Yunque	Porto Rico Sabana Seca	French Guyana
Guadeloupe Belle Plaine		0.216	0.020 (ns)	0.187	0.255	0.192	0.180	0.302	0.117
Guadeloupe Deshaies	0.246		0.227	0.482	0.467	0.434	0.401	0.546	0.314
Guadeloupe Le Moule	0.371	0.892		0.255	0.370	0.298	0.280	0.406	0.155
Marie Galante	0.518	0.836	0.822		0.456	0.396	0.401	0.587	0.337
Dominica	0.519	0.818	0.804	-0.006 (ns)		0.157	0.135	0.292	0.259
Martinique	0.485	0.821	0.800	0.172	0.176		0.119	0.322	0.171
Puerto Rico E Yunque	0.498	0.851	0.837	-0.047 (ns)	0.021 (ns)	0.263		0.189 (ns)	0.141
Puerto Rico Sabana Seca									0.253
French Guyana	0.431	0.776	0.802	0.377	0.232	0.432		0.386	

chloroplast microsatellites. *P. officinalis* does not give F_{stc} estimates higher than those found in continental species with a continuous range (Table 5). This result can be explained by the mode of seed dispersal of the latter species, i.e. gravity or animals with limited territory leading to the strong structure. Generally, the differentiation parameter is higher with cytoplasmic markers than nuclear markers (Petit *et al.* 2005), even in insular systems (Bottin *et al.* 2005; Bouvet unpublished data), this study was confirmed in our study.

In our study French Guyana is not strongly differentiated from the island population (Table 4 and Fig. 2a). With chloroplasts we observe a similar structure but with an additional complexity due to the position of Marie Galante outside the Guadeloupe cluster (Table 4 and Fig. 2b). Although homoplasy may be the cause of numerous identities per state, with highly variable stepwise mutating markers such as microsatellites (Estoup *et al.* 2002; Nesvacués & Emerson 2005) and the sample size is small leading to low precision in estimations, this differentiation pattern can also be explained by the mode of dispersal of seeds by flotation in connection with the route of migration based on marine streams suggested by Rivera-Ocasio *et al.* (2002) (Fig. 1). According to this first study showing marked differences between continental and island populations, and then a very limited gene flow between these two regions, our results suggest that the population from Caribbean islands may derive mainly from southern populations of Brazil and Guyanas. However, new sampling and analyses are needed to confirm this seed flow along the American coast and the Caribbean and the origin of West Africa.

Conservation of the species in island

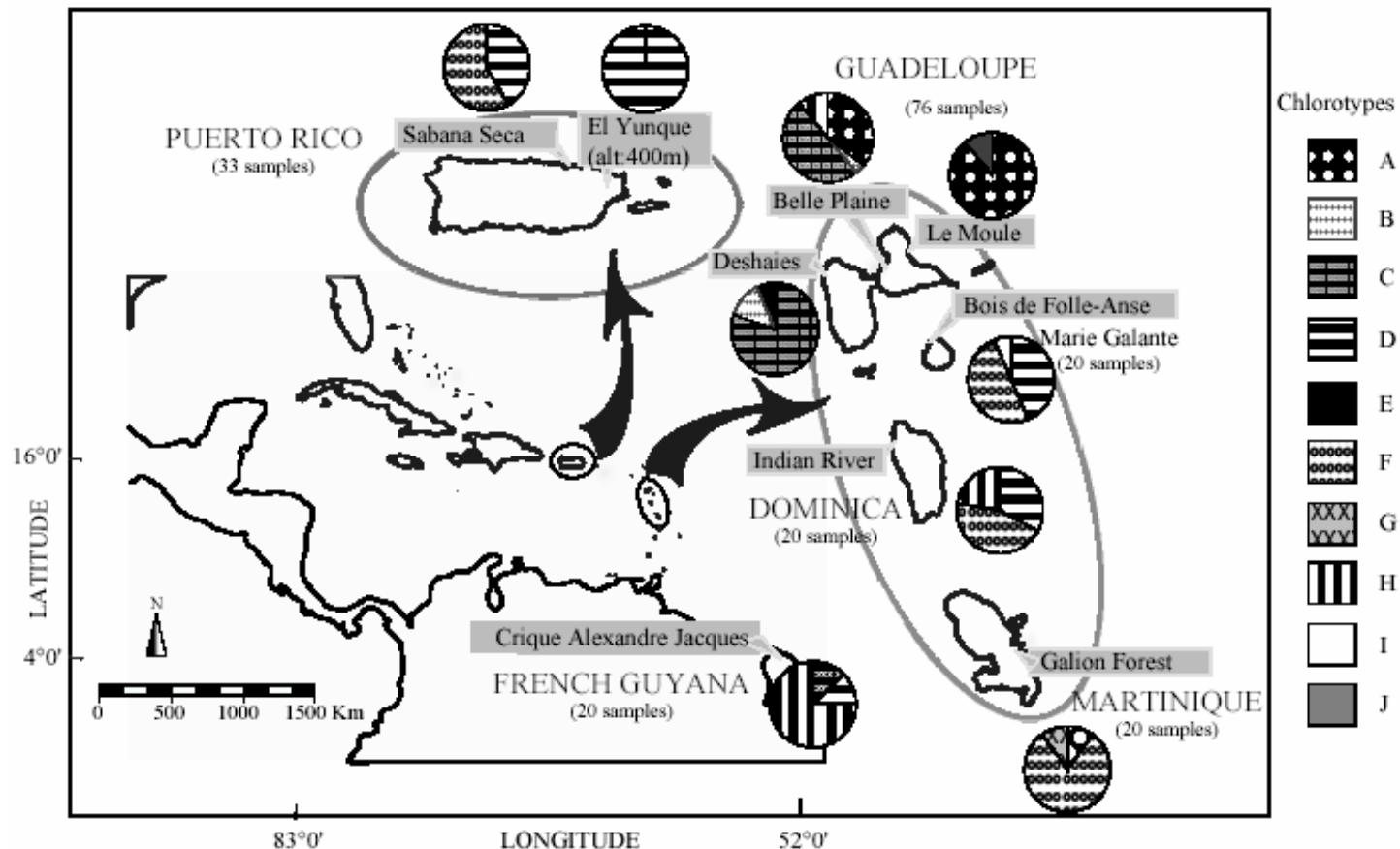
P. officinalis is distributed over a large area in the American continent and in small islands of the Caribbean Sea. Although the species seems to be abundant in the continental zone although it can be distributed in isolated populations

like in French Guyana, the size of the remaining populations in the islands is critical. Some populations in Dominica and in Guadeloupe comprised only a few trees. The island population genetic diversity is smaller than in the continental population (Table 2) and this loss of genetic diversity in small population size can reduce fitness (Frankham *et al.* 2002). In addition, the high fixation index found in some island populations is likely to indicate that inbreeding is present in some populations. Extinction due to inbreeding is among the most serious threats in small islands (Frankham 1998). Urgent measures need to be taken in some islands to protect *P. officinalis* and to implement a strategy of conservation.

To implement a strategy of conservation, one of the preliminary approaches consists in defining management units on the basis of molecular genetic differentiation of populations (Moritz 1994). The genetic distinctiveness can rely on the measurement of historical and recent gene flow between populations. Differentiation can be accepted when there is evidence of restricted gene flow using the rules of one migrant per generation $Nm < 1$ (Wang 2004), although this rule needs to be taken with caution ; some authors suggested to better use 10 migrants per generations to take into account the effective population size in models (Wang 2004). Our results showed that for nuclear microsatellites, among 36 Nm , 23 are smaller than one migrant per generation (m/gen), 12 are smaller than 2 m/gen and one is higher than 10 m/gen (case of populations of east of Guadeloupe). Chloroplastic microsatellites showed that $Nm > 10 m/gen$ in few cases. These preliminary results suggest that the island are to be considered as distinct management units. However this first approach needs to be completed by an ecological approach such as defined by Crandall *et al* (2000) which allows the integration of ecological variable to distinct populations within species.

In addition to the definition of management units, urgent measures are to be taken to restore the diversity. The reintroduction of protected seedlings by using the most appropriate provenances, i.e., those that

Fig. 4 : Chlorotype distribution of *Pterocarpus officinalis* jacq. in the Caribbean. The size of the circle is proportional to the size of population sampled



belong to the same management units or, if not possible, the same islands should be undertaken in order to maintain a good fitness (Wilkinson 2001).

Acknowledgements

We would like to thank the French Ministry MEDD (Ministère de L'Ecologie et du Développement Durable) for the financial support to implement the *Pterocarpus officinalis* project. This work was supported financially by the Guadeloupe Archipelago Region and the Social European Fund.

We are very grateful to colleagues at CIRAD, C. Leroux, G. Bena, and at the University of Antilles-Guyane for assistance in collecting samples, and to A. Vaillant and M. Poitel at CIRAD for their technical assistance in the laboratory.

Félix Muller is studying for a PhD at the University of Antilles-Guyane in Guadeloupe in collaboration with CIRAD, where he is analysing the pattern of diversity of *Pterocarpus officinalis* and the symbionts associated with the tree. He is also conducting experiments to clarify the role of symbiosis in the adaptation of the species in flooded zones.

Marie Voccia is an MSc student in forestry in the forestry school of ENGREF in Nancy, France.

Amadou Bâ is a professor at the University of Antilles-Guyane involved in research related to the functioning of symbiosis in various ecological contexts.

Jean-Marc Bouvet is the head of the research unit 'Genetic diversity and breeding of forest tree species' in the Forestry Department of CIRAD. His research interest is the analysis of the impact of evolutionary forces on genetic diversity using molecular tools and quantitative data in forest tree species.

References

Aldrich PR, Hamrick JL, Chavarriaga P, Kochert G (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree

Sympodia globulifera. *Mol. Ecol.*, **7**, 933-944.

Andrianoelina O, Rakotondraolina H, Ramamonjisoa, L, Danthu, P, Bouvet, J-M (2005) Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae), an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodivers. Conserv.*? in press.

Avise JC (2000) Phylogeography: The History and Formation of Species. *Harvard University Press, Cambridge, MA*.

Bacon (1990) Ecology and management swamp forest in the Guianas and Caribbean region. *Ecosystems of the World* **15**, 213- 250.

Barrett SCH (1996) The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, Ser. B*, **351**, 725-733.

Belkhir K, Borsig P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2001) GENETIX 4.03. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions* CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>

Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Vaillant A, Bouvet J-M (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Mol. Ecol.*, **14**, 1979-1989.

Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forest Research*, **20**, 254-257.

Bryan GJ, McNicoll J, Ramsay G, Meyer RC, De Jong WS (1999) Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 859-867.

Butaud JF, Rives F, Verhaegen D, Bouvet J-M, (2005) Phylogeography of Eastern

Table 5: Main parameters of diversity and differentiation between populations estimated with nuclear and chloroplast microsatellites in some tree species. Comparison with the present study.n : sample size, H_e : expected heterozygosity, F_{st} : differentiation index

Species	species characteristics			nuclear studies				chloroplast studies			
	distribution	mode of dispersal	n	H_{enuc}	F_{stnuc}	Reference	n	H_{cp}	F_{stcp}	Reference	
<i>Pterocarpus officinalis</i> jacq.	insulare	barochore/hydrochore	202	0.24-0.59	0.53	present study	116	0.22-0.68	0.51	this article	
<i>Santalum insulare</i>	insulare	zoochore	162	0.27-0.56	0.50	Lhuillier et al (np)	343	0.40 - 0.67	0.67	Butaud et al.(2005)	
<i>Santalum austrocaledonicum</i>	insulare	barochore/zoochore	431	0.11-0.74	0.33	Bottin et al (2005)	218	0.00-0.69	0.6	Bottin et al. (np)	
<i>Caryocar brasiliense</i>	continental	barochore/zoochore		0.58-0.85	0.11	Collevatti et al. (2001)	160	-	0.84	Collevatti et al. (2003)	
<i>Dalbergia monticola</i>	continental	barochore/zoochore					100	0.00-0.80	0.57	Andrianoelina et al. (2005)	
<i>Vitellaria paradoxa</i>	continental	barochore/zoochore	169	0.25-0.42	0.05	Sanou et al. (2005)	116	0.00-0.49	0.88	Fontaine et al. (2004)	
<i>Corylus avellana</i>		barochore/zoochore					248	0.43	0.85	Palme' & Vendramin (2002)	
<i>Grevillea macleayana</i>				0.42-0.53	0.22	England et al. (2002)					
<i>Vouacapoua americana</i>	continental	hydrochore		0.34-0.52	0.08	Dutech et al. (2004)					
<i>Sympomia globulifera</i>	continental	barochore/zoochore		0.72-0.85	-	Aldrich et al. (1998)					
<i>Swietenia humilis</i>	continental	barochore/zoochore		0.78-0.81	0.1	Lemes et al. (2003)					
<i>Swietenia macrophylla</i>	continental	barochore/zoochore			0.11	Novick et al. (2003)					
<i>Elaeocarpus grandis</i>	continental	barochore/zoochore		0.44-0.68	0.09	Rossetto et al. (2004)					

Polynesian sandalwood (*Santalum insulare*), an endangered tree species from the Pacific: a study based on chloroplast microsatellites. *J Biog.*, **32**, 1763-1774.

Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, **19**, 233-257.

Cintrón BB (1983) Coastal freshwater swamp forests: Puerto Rico's most endangered ecosystem. *A. E. Lugo Los bosques de Puerto Rico*. Institute of Tropical Forestry, USDA Forest Service, Rio Piedras P.R, 249-282.

Collevatti RG, Grattapaglia, D, Day, JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, **10**, 349-356.

Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2003) Evidence for multiple lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequence and microsatellite haplotype variation. *Mol. Ecol.*, **12**, 105-115.

Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol Evol*, **15**, 290-295.

Dutech C, Joly HI, Jarne P (2004) Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guiana populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. *Heredity*, **92**, 69-77.

El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832-839.

Emerson BC (2002) Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Mol. Ecol.*, **11**, 951-966.

England PR, Usher AV, Whelan RJ, Ayre DJ (2002) Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. *Mol. Ecol.*, **11**, 967-977.

Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259.

Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Mol. Ecol.*, **11**, 1591-1604.

Excoffier L, Smouse PE (1994) Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*, **136**, 343- 359.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.

Felsenstein J (1993) PHYLIP. Phylogenetic inference package, version 6.1. *University of Washington, Seattle, WA, USA*.

Fontaine C, Lovett PN, Sanou H, Maley J, Bouvet J-M (2004) Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*, **93**, 639-648.

Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, **10**, 500-1508.

Frankham R (1998) Inbreeding and extinction: island populations. *Conservation Biology*, **12**, 665-675.

- Frankham R, Ballou J D, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press. Cambridge, United Kingdom.
- Gamache I, Jaramillo-Correa JP, Pyette S, Bousquet J (2003) Diverging pattern of mitochondrial and nuclear DNA diversity in subarctic black spruce: imprint of a founder effect associated with postglacial colonization. *Mol. Ecol.*, **12**, 891-901.
- Gomez A, Gonzalez-Martinez SC, Collada C, Climent J, Gill L (2003) Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 1123-1131.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3) <http://www.nil.ch/izea/softwares/fstat.html>.
- Graham A (1995) Diversification of Gulf/Caribbean mangrove communities through Cenozoic time. *Biotropica*, **27**, 20-27.
- Grivet D, Petit RJ (2003) Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conserv. Gen.*, **4**, 47-56.
- Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF (2005a) A Spatial Statistical Model for Landscape Genetics. *Genetics*, **170**, 1261-1280.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005b) Geneland: a computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes*, **5**, 712-715.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, **347**, 1291-1298.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors affecting levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, **6**, 95-124.
- Hurlbert SH (1971) The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, **52**, 577-586.
- Imbert D, Bland F, Russier F (1988) Les milieux humides du littoral guadeloupéen. *Office national des forêts*, 40-49.
- Imbert D, Bonheme I, Saur E, Bouchon C (2000) Floristics and structure of *Pterocarpus officinalis* swamp forest in Guadeloupe, Lesser Antilles. *Journal Tropical Ecology*, **16**, 55-68.
- King RA, Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Mol. Ecol.*, **7**, 1151-1161.
- Lemes MR, Gribel R, Proctor J, Grattapaglia D, (2003) Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Mol. Ecol.*, **12**, 2845-2883
- Little EL, Wadsworth FH (1964) Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. *Forest Service, US Dept. of Agriculture, Washington, DC*. Agricultural Handbook No. 249:1217 pp.
- Lopez OR (2001) Seed flotation and post-flooding germination in tropical terra firma and seasonally flooded forest species. *Functional Ecology*, **15**, 763-771.
- Marshall HD, Newton C, Ritland K (2002) Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 367-378.
- Mengoni A, Barabesi C, Gonnelly C, Galardi F, Gabbielli R, Bazzicalupo M (2001) Genetic diversity of heavy metal tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): chloroplast microsatellite analysis. *Mol. Ecol.*, **10**, 1909-1916.

- Moritz C 1994 Defining significant units for conservation. *Trends Ecol. Evol.*, **9**: 373-375.
- Muller F, Vaillant A, Bâ A, Bouvet J-M (2005) Isolation and Characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq. *molecular Ecology Note in press*.
- Navascués M, Emerson BC (2005) Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Mol. Ecol.*, **14**, 1333-1341.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. *Columbia University Press*, New York, NY, USA.
- Novick RR, Dick CD, Lemes MR, Navarro C, Caccon, A, Bermingham E (2003) Genetic structure of Mesoamerican population of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **12**, 2885-2893.
- Palme AE, Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Mol. Ecol.*, **11**, 1769-1779.
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi, S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.*, **14**, 689-701.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Rivera-Ocasio E, Aide TM, McMillan W (2002) Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Mol. Ecol.*, **11**, 675-683.
- Rossetto M, Slade RW, Baverstock PR, Henry RJ, Lee LS (1999) Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia* - Myrtaceae). *Mol. Ecol.*, **8**, 633-643.
- Sanou H, Lovett N, Bouvet J-M (2005) Comparison of quantitative and molecular variation in agroforestry populations of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn) in Mali. *Mol. Ecol.*, **14**, 2601-2610.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometrics Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland*.
- Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* **43**: 1349-1368.
- Tarayre MP, Saumitou-Laprade J, Cuguen D, Couvet, Thompson JD (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.
- Tassin J (1999) Plant invaders in Réunion Island (French Overseas Territory, Indian Ocean). *Aliens*, **9**, 10.
- Wang J (2004) Application of one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conser. biol* **18**: 332-343.
- Weising K, Gardner RC (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, **42**, 9-19.



Capacité des graines de *Pterocarpus officinalis* à germer après flottaison des gousses en eau douce et en eau de mer

Introduction

Les marqueurs nucléaires ont révélé une plus faible différenciation chez *P.officinalis* en milieu continental par rapport aux îles. Ce résultat est en accord avec d'autres études réalisées sur des espèces insulaires telles que *Santalum austrocaledonicum* ou *S. insulare* (Bottin et al. 2005). Par contre, lorsque que l'on s'intéresse aux marqueurs chloroplastiques, la structuration génétique observée est équivalente à celles considérées pour des espèces continentales (Muller et al. soumis en 2006 à Conservation Genetics). En faisant l'hypothèse d'une transmission maternelle des chloroplastes, comme chez la majorité des Angiospermes (Conde et al. 1979; Neale & Sederoff 1989), l'utilisation des données sur la diversité génétique obtenue à l'aide des microsatellites nucléaires et chloroplastiques, nous a permis d'estimer le ratio du flux de pollen par rapport au flux de graines (Rp/g). Le mode de dissémination des graines par flottaison serait, selon l'une des hypothèses de Rivera-Ocasio (Rivera-Ocasio et al. 2002), à l'origine de la colonisation des Amériques par *P. officinalis* via le courant du Benguela reliant la côte sud-ouest africaine aux côtes brésiliennes du Nord-Est. Il est vrai que les espèces vivant en forêt marécageuse sont connues pour être plus aptes à germer après flottaison par rapport aux espèces de terre ferme (Lopez 2001). Les gousses de *P. officinalis* ne dérogent pas à la règle puisqu'elles continuent dans leur très grande majorité (près de 100%) à flotter après un séjour de plus de 2 mois en eau douce et les deux tiers d'entre elles conservent leur capacité de germination (Lopez 2001). Si la survie des graines de *P. officinalis* a été déjà évaluée après une longue période de flottaison en eau douce (Lopez 2001), leur réaction à l'eau de mer n'a pas été testée. Le présent travail a pour objet d'évaluer la capacité des graines à germer après flottaison des gousses en eau de mer.

Matériels et méthodes

Flux de graines et flux de pollen

Les flux de gènes par pollen et par graines ont été comparés en se fondant sur les travaux de Ennos et Tarayre (Ennos 1994; Tarayre et al. 1997). Le ratio flux pollen/flux de graines (Rp/g) a été estimé à l'aide de la formule d'Ennos (Ennos 1994), tenant compte de la consanguinité au sein des populations (Fis): $Rp/g = [A(1+Fis)-2C]/C$, où $A=(1/Fstnuc - 1)$ et $C=(1/Fstcp - 1)$

Fis : indice de fixation ; $Fstnuc$: déficit en hétérozygotes observé avec les microsatellites nucléaires ; $Fstcp$: déficit en hétérozygotes observé avec les microsatellites chloroplastiques

Germination des graines après flottaison des gousses

Nous avons installé une cage flottante en bord de mer au niveau du ponton de l'institut de Biologie Marine en Guadeloupe dans laquelle des gousses en provenance de Folle-Anse (Marie-Galante) ont été mises en eau de mer dont la salinité (36 g/l) est restée constante tout au long de l'expérience (Figure 21 et 22). En parallèle, des gousses provenant de la même origine, ont été mises dans des bacs contenant de l'eau douce (eau du robinet) à température ambiante au laboratoire. Toutes les semaines, 25 gousses issues de chacun des deux traitements ont été décortiquées. Les graines ont ensuite été semées dans un mélange de pouzzolane et de vermiculite préalablement stérilisé et mise à l'obscurité à température ambiante au laboratoire. Un lot de 40 graines, n'ayant subi aucun traitement (durée de flottaison $T=0$), a permis de déterminer la capacité de germination initiale. Nous avons évalué la capacité des graines à germer après des durées variables de flottaison ($T= 1, 2, 3, 4, 5$ et 6 semaines) en eau douce ou en eau de mer. Pour cela, nous avons compté les graines ayant germé (radicule mesurant au moins 1 cm) et graines rendues stériles par leur état de décomposition dans la gousse même et celles considérées comme mortes car attaquées par la pourriture une fois mise à germer. L'expérience a duré six semaines.



Photo : Muller F.

Figure 21. : Gousses matures de *P. officinalis* (Forêt de Folle-Anse à Marie Galante)



Photo : Muller F.

Figure 22. : Cage flottante dans laquelle les gousses de *P. officinalis* ont séjourné
(Ponton du Laboratoire de Biologie Marine, Guadeloupe)

Résultats

Ratio flux de pollen/flux de graines

Le ratio flux de pollen/flux de graines estimé à l'aide de la formule d'Ennos (Ennos 1994) est $Rp/g = 2,18$ pour toutes les populations étudiées confondues. Afin de comparer les flux de gènes à longue et à courte distance, la même approche a été utilisée uniquement sur les trois populations étudiées en Guadeloupe. Bien que ces trois populations soient géographiquement proches, le ratio obtenu est similaire à celui observé pour toutes les populations confondues avec une valeur avec Rp/g de 2,88.

Capacité germinative des graines après traitement des gousses

A $T=0$, toutes les graines ont germé en moins d'une semaine. Il en est de même pour les graines issues de gousses en eau douce. La capacité de germination de ces graines est à peu près comparable quel que soit le temps de flottaison des gousses. (Figure 23).

Pour les gousses soumises à l'eau de mer, le taux de germination des graines passe de 56% à 16% entre la première et la seconde semaine de traitement. Il devient à peu près nul dès la 3ème semaine de flottaison (Figure 23). La salinité mesurée à l'intérieur des gousses est équivalente à celle retrouvée dans l'eau de mer (36g/l) dès la première semaine de traitement.

Pourrissement des graines issues de gousses en eau douce ou en eau salée

Dans le lot témoin ($T=0$), aucune graine n'a présenté de signe de putréfaction une fois mise à germer. Pour les gousses soumises à l'eau douce, les premières graines pourrissant après semis n'apparaissent que lorsque la flottaison atteint trois semaines. Cependant, leur nombre reste faible (Figure 24). Aucune graine n'était en état de décomposition lors du décorticage, et ce même après six semaines de traitement. Par contre, les graines soumises à l'eau de mer, une fois semées, sont

rapidement attaquées probablement par le sel et pourrissent en grand nombre dès la première semaine de traitement (Figure 24). A partir de la quatrième semaine de flottaison, 50% des graines sont dans un état de décomposition avancée. A la sixième semaine le pourcentage des graines décomposées atteint 90% (Figure 24).

Temps de germination en fonction des traitements

Dans le lot témoin ($T=0$) sans traitement, près de 90% des graines ont germé au cours de la seconde semaine suivant le semis, alors que moins de 10% des graines semées avaient germé pendant la première semaine (Figure 25).

Les graines ayant subi le traitement à l'eau douce ont germé massivement dès la première semaine quelle que soit la durée du traitement (Figure 25).

Pour les graines soumises à l'eau de mer, seuls les traitements d'une et de deux semaines sont représentés, puisque au-delà de ces durées, très peu de graines étaient viables (une seule graine a supporté 4 semaines de traitement). La majorité des graines ont germé au cours de la seconde semaine qui a suivi le semis mais le séjour en eau de mer a semblé ralentir la germination (Figure 25).

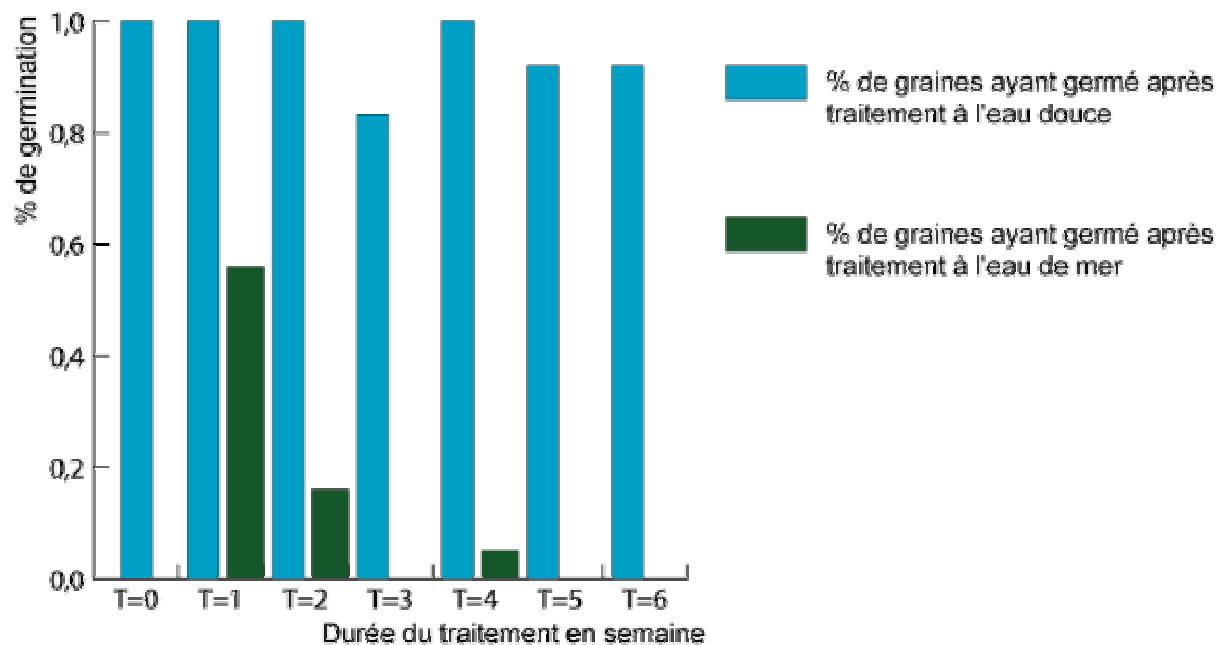


Figure 23. : Pourcentage de graine de *P.officinalis* ayant germé après traitement dans l'eau douce et dans l'eau de mer.

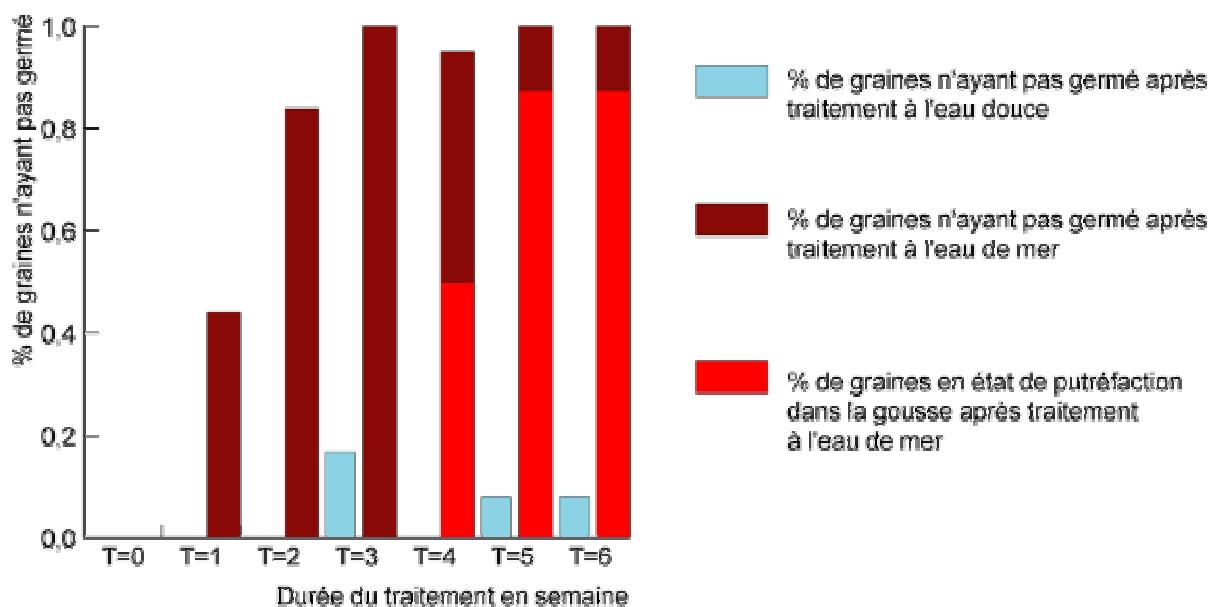


Figure 24. : Pourcentage de graine de *P.officinalis* n'ayant pas germé après traitement dans l'eau douce et dans l'eau de mer.

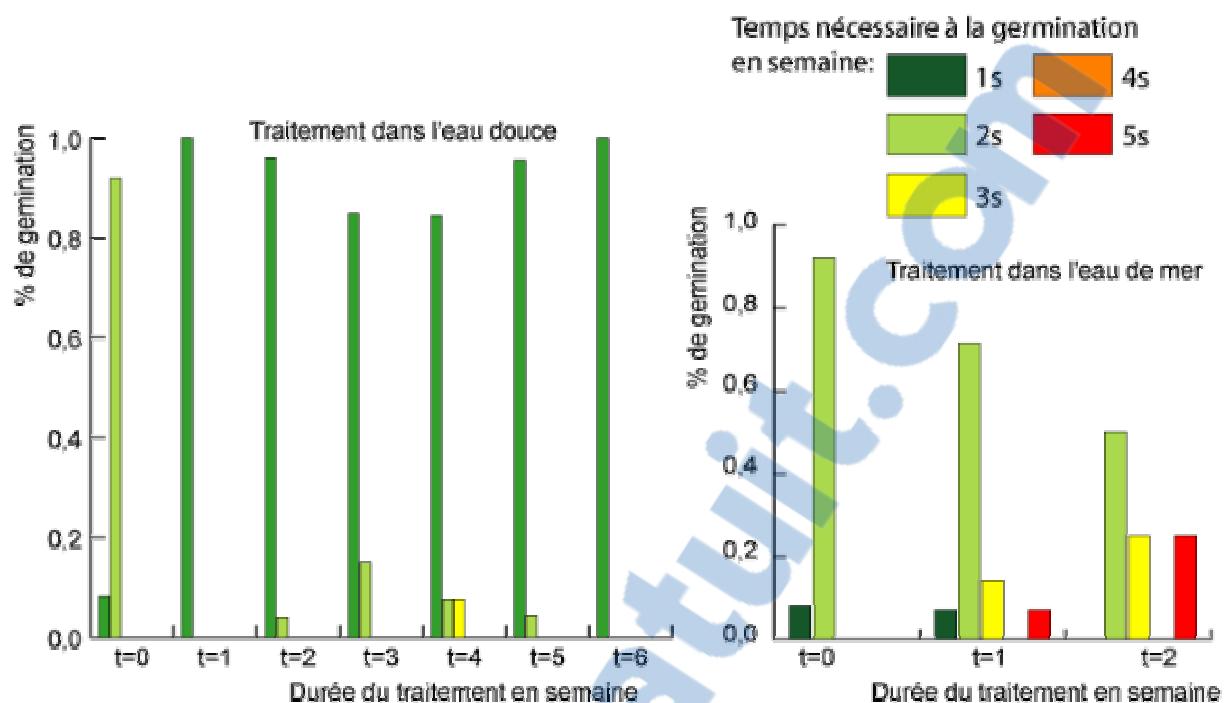


Figure 25. : Temps nécessaire à la germination des graines de *P.officinalis* après traitement à l'eau de mer et à l'eau douce.

Discussion et perspectives

Flux de gènes par pollen/flux de gènes par les graines

L'utilisation de marqueurs nucléaires et cytoplasmiques nous a donné l'opportunité de comparer les flux de gène par pollen et par graine chez une espèce présente à la fois au niveau insulaire et sur le continent. Il y a peu d'études associant ces deux types de marqueurs nucléaires et cytoplasmiques chez les Angiospermes arborescentes (Petit et al. 2005). Cependant, un ratio élevé en faveur des flux de pollen chez les espèces continentales à pollen anémochores, ainsi que chez les Gymnospermes a été observé. C'est par exemple le cas des espèces telles que *Fagus silvatica* ($Rp/g=84$), *Quercus robur* ($Rp/g=286$), *Quercus petraea* ($Rp/g=500$) (King & Ferris 1998), et *Picea mariana* ($Rp/g = 77$) (Gamache et al. 2003). Ce ratio est moins élevé chez des espèces à dispersion zoothore du pollen, et dont les graines se dispersent par gravité (barochore) ou par les insectes (zoothore), comme c'est le cas chez *Vitellaria paradoxa* ($Rp/g =47$) (Fontaine et al. 2004) ou *Dalbergia monticola* ($Rp/g =15$) (Andrianoelina et al. 2005). Cependant, le ratio flux de pollen/flux de graines est plus faible chez *P. officinalis* ($Rp/g= 2,18$), ce qui peut s'expliquer par sa distribution fragmentée et son mode de dispersion des graines par flottaison. Par ailleurs, des valeurs similaires sont observées chez *Santalum austrocaledonicum* en nouvelle Calédonie ($Rp/g=3,82$) et chez *Santalum insulare* en Polynésie Française ($Rp/g=2,13$), toutes deux pollinisées par les insectes, et dont les graines sont dispersées par les oiseaux (Bouvet, données non publiées).

Viabilité des graines après flottaison des gousses

Les graines de *P. officinalis* ont gardé leur pouvoir germinatif, même après avoir séjourné six semaines dans l'eau douce. Ce résultat est en accord avec celui de Lopez (Lopez 2001). De plus, le temps nécessaire à la germination semble inférieur à celui observé chez le témoin T=0. Ce dernier résultat pourrait indiquer, que la flottaison en eau douce a un impact positif sur la germination des graines. Il se

pourrait aussi que les graines du lot témoin n'aient pas atteint leur pleine maturité au moment de la récolte.

Dans l'eau de mer, la capacité germinative des graines décroît très rapidement. Ceci serait consécutif à la pénétration de l'eau de mer à l'intérieur de la gousse. En outre, la durée de la flottaison des gousses en eau de mer semble augmenter le délai de germination des graines. On peut donc penser que les graines de *P.officinalis* seraient tolérantes aux sels tout au plus après deux semaines de flottaison des gousses en eau de mer.

Les graines de *P.officinalis* sont particulièrement bien adaptées aux milieux marécageux, fréquemment inondés en eau douce et/ou en eau saumâtre. En Guadeloupe, la fin de fructification et la dispersion des graines concordent avec le début de la saison des pluies vers avril et mai. Les graines pourraient ainsi profiter de la montée de l'eau douce en forêt marécageuse pour se disperser au gré des courants et éventuellement circuler en mer.

Si on se base sur une vitesse moyenne (1 et 2 km/h) des courants du Sud au Nord de l'archipel des Petites Antilles une graine serait susceptible de parcourir en deux semaines une distance comprise en 330 et 660 kilomètres. Évidemment, une dispersion sur d'aussi longues distances risque d'être particulièrement rare, et soumise à de nombreux aléas. Compte tenu du fait que les îles de l'archipel des petites antilles sont séparées par des bras de mer de quelques dizaines de kilomètres, la dissémination d'île en île par la mer aurait des chances de succès significatives. Surtout si on ajoute à ça certains événements pouvant favoriser le passage des graines du milieu marin vers les plaines cotières, tel que les tempêtes et cyclones, mais aussi le volcanisme (l'effondrement du dôme du volcan de Montserrat en mer au printemps 2006 à provoqué la formation d'un petit raz de marée sur les côtes nord de la Guadeloupe). La présence relativement récente de *P.officinalis* en zone néotropicale, estimée tout de même au Pléistocene (-10000 et -1,8Ma) (Graham 1995), rend d'autant plus probable la colonisation des Petites Antilles par voie marine. Ces résultats corroborent les observations obtenues avec les marqueurs génétiques à savoir une dispersion facilitée par les graines ($Rp/g=2,18$), et une distribution des chlorotypes présentant une structuration relativement

faible par rapport aux attendus. Cependant, les effets d'homoplasie observés avec les marqueurs microsatellites (Estoup et al. 2002; Navascués & Emerson 2005), nous incitent à rester prudent face à ces résultats. Aujourd'hui encore, *P. officinalis* se disperserait entre les îles par voies marines grâce à ses gousses monospermes flottantes, même si la dispersion et l'implantation d'une graine "exotique" reste un événement relativement rare.

Jusqu'à présent les graines sont stockées à 4°C au laboratoire et doivent être utilisées dans des délais relativement brefs sans quoi elles se dessèchent et perdent toute capacité germinative. Les résultats obtenus sur la germination des graines après flottaison des gousses pourraient nous inciter à stocker nos graines dans des bacs d'eau douce pour une utilisation au cours des deux mois suivants. Ce moyen de stockage serait très peu contraignant si un dispositif de renouvellement automatique de l'eau est mis en place.

Afin de compléter cette manipulation sur la germination des graines de *P. officinalis*, il serait intéressant d'affiner nos résultats en testant quotidiennement la viabilité de plusieurs lots de graines pendant deux semaines, mais aussi l'impact de la maturité des graines en récoltant des graines tombées d'elles-mêmes. Cependant ce dernier point est relativement difficile et contraignant à mettre en œuvre.

**Chapitre 3 : Diversité génétique des
Bradyrhizobium de *P. officinalis* Jacq en
forêt marécageuse dans la région
Caraïbe**

Introduction à la publication 3

Nous voulions déterminer quels étaient les genres bactériens associés à *P.officinalis*, mais aussi dans quelles mesures l'insularité et la spécificité d'hôte pouvaient influencer la diversité bactérienne. Pour ce faire, la diversité des bactéries isolées à partir de nodule de *P.officinalis* en forêt marécageuse a été appréhendée par le séquence de la région ITS comprise entre les parties codantes des ARN 16S et 23S.

Des études précédentes avaient montré que le genre *Bradyrhizobium* domine largement les associations symbiotiques dans les forêts marécageuses de Guadeloupe, dans la partie brésilienne de l'Amazonie (Moreira et al. 1998), au Vénézuela (Barrios & Herrera 1994), ainsi qu'en Guyane Française (Koponen et al. 2003). Cette dominance des *Bradyrhizobium* est peut être liée à l'acidification des sols en forêts marécageuses, et la tolérance de ce genre bactérien (Graham 1992). Mais, peut être aussi à leurs capacités à supporter les cycles d'inondation et de sécheresse, ainsi que les conditions d'anérobiose (Koponen et al. 2003).

Les résultats obtenus nous ont amenés à nous interroger, sur l'influence du milieu marécageux, sur l'impact de la composition floristique des forêts marécageuses, mais aussi sur la possibilité d'une dispersion massive de microorganismes par voie marine ou aérienne.

Manuscrit III

**Genetic diversity patterns of Bradyrhizobium
strains associated with Pterocarpus officinalis
Jacq. in continental and insular Caribbean zones.**

MULLER Félix, LE ROUX Christine, BOUVET Jean-Marc, DREYFUS Bernard, BÂ Amadou and BENA Gilles (En préparation)

(In preparation)

Genetic diversity patterns of *Bradyrhizobium* strains associated with *Pterocarpus officinalis* Jacq. in continental and insular Caribbean zones

MULLER Félix^{1,2,3}, LE ROUX Christine², BOUVET Jean-Marc³, DREYFUS Bernard²,
BÂ Amadou^{1,2} and BENA Gilles^{2*}

(1) Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles et de la Guyane, BP. 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.

(2) Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113
IRD/INRA/CIRAD/ENSA-M/UM2, campus international de Baillarguet, TA 10/J, 34398 Montpellier cedex 55, France.

(3) CIRAD, Forest Department, research unit "Genetic Diversity and Breeding of Forest Tree Species" Campus international de Baillarguet TA 10/C 34398 Montpellier cedex 5 France

Corresponding author: E-mail : gilles.bena@mpl.ird.fr

ABSTRACT

The legume, *Pterocarpus officinalis* Jacq., is a tropical marshy tree forest endemic to the Caribbean islands and south American continent. As many legumes, *P. officinalis* is able to interacts with soil bacteria, commonly referred to as rhizobia, in a nitrogen fixing symbiosis. We quantified the genetic diversity and structure of bacteria isolated from nodules collected on eight *Pterocarpus* populations from Caribbean islands and one *Pterocarpus* population from French Guyana in the South American continent. Bacterial genetic diversity in *P. officinalis* nodules was characterized by using the intergenic spacer of the 16S and 23S rRNA gene sequences. All *P. officinalis* associated bacteria belong to the *Bradyrhizobium* genus. Insular bacterial genetic diversity is nearly null, and all bacteria but one sampled in these islands showed a sequence homology with a *Bradyrhizobium* genospecies V West African strain higher than 99% (and for most of them 100%). Conversely strains isolated from the continental populations in French Guiana displayed a larger genetic diversity, and could not be related to any sequence found in the data bank. One strain from Porto Rico could be related, although divergent, to these continental strains. The extremely low genetic diversity within and among bacterial insular populations is more problematic to explain. Although the low within-population diversity could be explained by recurrent bottleneck, it does not explain the lack of divergence, at least by drift, among populations and islands. Similarly, the *P. officinalis* monospecific status of forest where bacteria were sampled may act as a strong selective pressure on the bacterial diversity, such pressure being released in French Guiana population where *Pterocarpus officinalis* grow in association with other plant species.

Keywords : insularity, *Pterocarpus officinalis*, *Bradyrhizobium*, ITS, genetic diversity, gene flow

Introduction

Pterocarpus officinalis Jacq. (Leguminosae), is one of the most important freshwater wetland tree species in the Caribbean (Bacon 1990; Muller et al. 2006; Muller et al. soumis en 2006 à Conservation Genetics). It covers large areas of the coastal floodplain, individual trees and small stands occurring along rivers and in the Luquillo Mountains (Cintrón 1983). During the last two centuries, the distribution of *P. officinalis* was greatly reduced when coastal plain forests were cut and drained for human buildings and agriculture. Nowadays, most populations of *P. officinalis* are restricted to areas adjacent to mangroves, where changes in hydrology and salinity scale could affect the survival of these stands as the extremes of their physiological ability.

As most legumes, *P. officinalis* is able to establish a mutualistic relationship with nitrogen fixing bacteria (Bâ et al. 2004; Saur et al. 1998). The free-living soil bacteria colonize the roots of its host-plant in specialized structures known as nodules. In these nodules, bacteria, modified as bacteroid, fix atmospheric nitrogen, and provide ammonium to the plant which in return provides carbohydrate compounds to the bacteria. This symbiosis is thus usually perceived as a true mutualism, with reciprocal benefits to both partners. Freshwater swamp forests present slow mineralization rates (Barrios & Herrera 1994), and denitrification, forcing legumes tree to form the N₂-fixing symbiosis for fulfilling the high N demand typical for most legumes (McKey 1994). Severe waterlogging does not favour nodulation, but nitrogen fixation in *P. officinalis* is apparently not restricted,

indicating its good adaptation to swamp forests (Koponen et al. 2003). Nodulated legumes trees have been described as more common in flooded than in *terra firme* forest in French Guiana (Koponen et al. 2003), and in flooded forest of Orinoco basin in Venezuela (Barrios & Herrera 1994; Sprent 1999), and nodulation are more frequent in Brazilian Amazonia (Moreira et al. 1998). In Guadeloupe island (French West Indies) all legumes trees examined so far were found as nodulated (Koponen et al. 2003).

Several studies have compared the genetic diversity and structure of both symbionts (Aguilar et al. 2004; Parker et al. 2004), suggesting that coevolution may have occurred between plants and their bacterial partner. However, none of them has yet been conducted in an insular frame, which has numerous particularities compared to mainlands (Gomez et al. 2003), such as their isolated status, small size, and the small numbers of colonisers. So, islands exacerbate the effect of genetic drift, the effect of inbreeding depression and the differentiation between the populations within species (Barrett 1996).

Numerous approaches in plants have been implemented to understand the pattern and process of species diversity and speciation using phylogenetic theory (Emerson 2002). Experimental results in groups such as animals have confirmed the theoretical models and have indicated that differentiation between island populations is high and that islands usually contain less genetic variation (Frankham 1996). However, the influence of many biophysical and biological factors in the pattern of within-plant genetic diversity in island

systems is still poorly documented. For example, the interaction between the geographic distribution of (small) islands and the mode of seed dispersal and the distribution of genetic diversity is not well known. This is particularly true for tree species, although they represent an important component of the ecosystem and play a significant role in economic and environmental issues of islands.

Rhizobia, in sense of “nodulating bacteria”, mainly belonged to the alpha-proteobacteria clade, although some of them were recently described from the beta-proteobacteria group (Chen et al. 2001; Moulin et al. 2001). Bacterial nodulation capacity may have been acquired in a single lineage well after diversification of bacteria, and subsequently, symbiosis genes may have been spread by lateral gene transfer among the different genera and species (Hirsch et al. 2001). 16S rRNA sequence is a good genetic marker to infer interspecific links on numerous bacteria genus, as the 16S-23S rDNA spacer data allowed us to determine intraspecific relationships (Leblond-Bourget et al. 1996). *Bradyrhizobium*, a genus of slow-growing, present a high degree of conservation on their 16S rRNA genes, but the spacer region between 16S and 23S rRNA gene (ITS, internal transcribed spacer), can provide information to elucidate inter- and infraspecific relationship. *Bradyrhizobium* ITS sequence compared to more laborious AFLP, and DNA-DNA hybridization techniques have been demonstrated to be very useful to genotypically characterise bradyrhizobia (Willems et al. 2003).

The aims of our study were (i) to quantify the genetic variation within and between populations of *Pterocarpus officinalis* populations, (ii)

to investigate the diversity and distribution of associated bacterial strains isolated from geographically distinct regions in the Caribbean, and (iii) to investigate a putative costructuration between the two symbiotic partners.

Materials and Methods

Sampling schemes

Plant sampling schemes are described elsewhere (Muller et al. soumis en 2006 à Conservation Genetics). At the same time, associated *P.officinalis* nodules were collected in each population. Approximatly ten nodules from each sampled plant were harvested. They were immediately dried using silica gel tube for subsequent bacterial isolation. We also included in our study a collection of nodules sampled in 2002 from nearly all known population of *P. officinalis* in Guadeloupe (Bâ et al., 2004).

Isolation of rhizobial strains

Back in the lab, nodules stored in silica gel tubes were transferred for 30 minutes to an Eppendorf tube containing sterile water. The nodules were surface sterilised by immersing in 30% H₂O₂ for 7 minutes, and rinsed four times with sterile distilled water. The aseptic nodules were individually crushed in a drop of sterile yeast-mannitol broth, and the suspension was placed in lines onto yeast-mannitol agar plates (Vincent 1970). Pure cultures were obtained after many subculture steps at 28°C.

PCR amplification of bacterial rDNA region

A loopful of rhizobial cells was suspended in 20 µl of sterile water and

boiled for 5 min. Cell debris was removed by centrifugation at 13,000 rpm for 1 min at room temperature, and 2 µl of the supernatant was used as a template for PCR. Twenty-five microliters of reaction mixture containing 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.8 µM of each primer, 1.5 mM of MgCl₂, 1.25 U of Taq DNA polymerase (Promega, Charbonières, France) and the buffer supplied with the enzyme was used for PCR amplification by a Perkin-Elmer model 2400 thermocycler (Perkin Elmer Applied Biosystems, Norwalk, USA).

The oligonucleotides (Eurogentec) used for priming PCR were derived from the 16S and the 23S rDNA genes flanking the internal transcribed spacer (ITS). They had the following sequences: 5' CCTGGGGAGTACGGTCGCAAG 3', 213, sense; *Escherichia coli* numbering 882 to 902, on the 16S rDNA gene, and 5' CCGGGTTTCCCCATTGG 3' FGPL 2054', antisense, beginning of the 23S gene (Sneath & Sokal 1973).

The PCR was done as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 35 cycles consisting of a 30-s denaturation at 94°C, 1 min at an annealing temperature of 55°C, followed by a 3-min primer extension at 72°C. The amplified 1630-bp fragment obtained was purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, France).

ITS sequencing

The purified PCR products were directly sequenced on both strands using the following sequencing primers:

5' CTTGTAGCTCAGTTGGTTAG 3'*
BR5, sense, located inside the tRNA^{Ile}

gene (Willems, et al., 2001b); and 5' CCGGGTTTCCCCATTGG 3' FGPL 2054', antisense, beginning of the 23S gene (Sneath & Sokal 1973). Sequencing was performed using a BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA) and reactions were analyzed on an automated DNA sequencer (Applied Biosystems model 310, Perkin Elmer Applied Biosystems).

Identification and analyses of rhizobial strains

The 16S-23S rDNA sequences were aligned with CLUSTAL X (Thompson et al. 1997) and compared to all other sequences available in the GenBank database, by using the algorithm BLASTN for identifying the most similar sequences, especially from the yet described *Bradyrhizobium* genospecies.

RESULTS AND DISCUSSION

Diversity and distribution of bacterial isolates

Root nodules were sampled from the nine populations. About 120 bacteria strains were subsequently isolated in the lab, among which 47 were amplified and sequenced. We also added in the study 22 strains that had been sampled in 2002, covering all known populations of *P. officinalis* in Guadeloupe, as a first survey of bacterial diversity. Sequence length obtained ranged from 229 to 519bp, with a mean sequence length of 443bp.

The 66 sequences obtained fall in two genetic groups based on sequence homology (see table X).

The 59 first strains originated from all populations but Guiana, showed a very low level of divergence, with only 6 polymorphic sites (along the 466 aligned matrix) and 2 synapomorphies (i.e. polymorphism shared by more than one sequence). Sequences from this group are closely related (100% of homology for most sequences) to the previously published *Bradyrhizobium* sp. genospecies V (strain ORS176, Willems et al. 2003) that was isolated from *Faidherbia albida* in Senegal. Six different alleles can be distinguished among the 59 strains, with one predominant (46 individuals sharing the same haplotype), the two other most frequent haplotype grouping 6 and 5 individuals respectively. Three haplotypes are each only represented by a single strain. The two synapomorphies observed do not group strains according to their geographical origin, one grouping strains from various populations of Guadeloupe, the second being shared by strains from both two populations of Guadeloupe and one from Martinique.

The second group included 7 strains sampled in French Guiana, plus one from Porto Rico. Although quite similar, the 8 sequences display a higher nucleotidic divergence, with both indels and punctual mutations. Five strains are very similar (97-99% homology), with 14 polymorphism along the 405 bp aligned sequences. The last group of sequence includes one strain from Guiana and one from Porto Rico. These two sequences share three insertions relatively to the other sequences (3, 7 and 9 bp), and Porto Rico strain also displays a large (82 bp) insertion and a 27bp deletion. There is no evident kindship between all these sequences and sequences deposited in the data bank. The 6 first sequences are more closely related to a *Bradyrhizobium* sp. Ty2a-2 isolated

from *Tachigali versicolor* in Panama, and to a *Bradyrhizobium* sp. strain isolated from a *Vigna unguiculata* plant in Senegal.

The *Bradyrhizobium* genus is usually considered as one of the most diverse and ubiquitous symbiotic bacteria; Although still abstruse, taxonomical studies of this genus have permitted the delineation of **X** species and **Y** genospecies, these latter being defined on the basis of AFLP and 16S-23S sequence. Bradyrhizobia strains have been described in various tropical regions and isolated from multiple plant species. For instance, Parker (Parker 2003) isolated 96 strains from 10 legume host species from Panama, and found 13 different genotypes (one representing 46% of the strains) with no clear host plant specificity. Krasova-Wade et al. (Krasova-Wade et al. 2003) analysed 85 strains sampled from *Vigna unguiculata* in a single location, and observed 4 different type of strains (based on both sequence and RFLP), whereas a sampling over multiple populations of *V. unguiculata* in Senegal displayed 20 different types falling in different genospecies clade, and that could form potential new genospecies (Neyra, pers. comm.).

Bradyrhizobium and tropical swamp forests

Under equally swampy conditions, *Bradyrhizobium* is the dominant group of symbiotic N₂-fixing bacteria in Guadeloupe, French Guiana (Koponen et al. 2003), and in Brazilian Amazonia (Moreira et al. 1992). The relative aciditic water in the swamp forest could act as a selective pressure. Slow growing rhizobia, in particular *Bradyrhizobium* has know to present better acidic conditions tolerance than other rhizobia genus (Graham 1992; Koponen et al. 2003). Thus, it may be

because some *Bradyrhizobium* strains or species are able to tolerate the wetting and drying cycles and anoxic conditions of the different seasonal and soil conditions found in tropical swamp forests (Koponen et al. 2003)

Bradyrhizobium pattern diversity and ITS genetic markers

Diversity polymorphism pattern of french Guyana *Bradyrhizobium* depict an important diversity in opposition to the absence of diversity in insular samples. First we can ask them about ours bacterial genetic marker to be able to detect diversity in insular system. Low-level deviation in insular bacterial populations is not to correlate to global genomic divergence. furthermore, lastest results based on pfge analysis mean to suggest that some genomic diversity is present for some insular bacteria strain, witch was similar with ITS sequences. In all case, deviation is existing between continental and insular strains as insular strains show 100% of ITS homology with *Bradyrhizobium* sp V when none of them are common with French Guyana strains.

Bradyrhizobium diversity and floristic composition

One other interpretation could be found in an major selectif effect of floristic composition and it's difference between insular and continental *P.officinalis* population. In fact, insular *P.officinalis* sampled populations are strongly monospecific about floristic composition. *P.officinalis* can represent up to 90% (ref) of the trees stratum in fresh and brackish water wetlands. Moreover very few other legumes genus can be found in this kind of forest. For exemple, in Guadeloupe island only one dalbergia genus is present, in the *P.officinalis* forests. In

constrats, the continental french Guyana *P.officinalis* population are dispersed along a river, and the forest present a great diversity in term of floristic composition, and legumes genus diversity. *P.officinalis* represent about 25% of the tree stratum, and about 37,5% of nodulated leguminous plants. It's seem, that plant diversity impacted ecosystem processes by modifying the composition and function of heterotrophic microbial communities, especially when soil contained very little organic matter (ZAK et al. 2003), as we can found under flooded condition in the insular *P.officinalis* forest.

By supplying its host with nitrogen, rhizobium presumably increasing its access to photosynthate, and this carbon compounds could otherwise have used to support their own current or future reproduction. Furthermore, a single founding rhizobium may produce a billion or more descendants inside a nodule (Denison & Kiers 2004). The bacteroids ability to redifferante from a senescent nodule appeared to be particulary high, witch is in agreement with current evolutionary models suggesting that nitrogene fixing rhizobia shoud have highter survival probability, after nodule senescence, than free-living rhizobia in rhizosphere (Müller et al. 2001b; Provorov 1998). So the bacteria insular lack of diversity could be explain by a strong selectivity effect acted by *P.officinalis*.

Floristic composition could be emphasised by other effect as well as flooded and salinity condition in insular population, wich is not found in the French Guyana population.

Thought we overlay different effect, without our sampling allows us to detect, witch one is more relevant, as more as we dont take act about insular demographic effect, as well as fondation effect, insular migration, effective population size, witch was

impliqued in genetic drift of insular populations

Bradyrhizobium disperion ?

A really effeciant dispersal system could explain how the same bacteria strain can be found in different insular sampled site, and more, why insular bacteria strain are ITS genetically closed to African strain. Wind could be a good applicant for a rapid microorganism dispersal, in broad habitation panel (Isard & S.H 2001; Prospero et al. 2005). Long distance dispersal should be link to atmospheric currents, and their physical chemistry feature, and of course run time which affect survival. One studies realized in France about microorganism atmospheric diversity introduce the strong predominance of proteobacteria, and the important part of α proteobacteria (about 19%), witch include symbiotic bacteria as *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Bradyrhizobium* (Maron et al. 2005)

Recent studies about bioaerosol composition at Barbados (West Indies), present correlation between West African dust amount and concentration of living bacteria and fungi found in the atmosphere (Prospero et al. 2005). Among alive isolated bacteria in Caribbean atmosphere could be pathogenic for plant and animals, likewise symbiotic (Griffin et al. 2003). One of the particularity of West African bioaerosol air transport to the Caribbean lie for part on aride country origin of microorganism consequently more resistant to osmotic stress, and on the low altitude of dust transport, close to the marine layer (Prospero et al. 2005). This kind of transport need less about one week to be realised (Griffin et al. 2003; Prospero et al. 2005). Genetic similarity was found between isolated microorganism strain from Malia and

Caribbean atmospheric. For some strain the 16S DNA genetic homology between African and Caribbean microorganisms reach to 100% (Kellogg et al. 2004)

Conclusion

The extremely low level of bacterial diversity in insular populations, in comparison to continental populations, may result from successive bottleneck in these populations. But in this case one would expect a strong influence of genetic drift on insular bacterial genetic pattern, leading to a differentiation among insular populations, which is not the case. Lack of genetic diversity in insular populations could also be under the influence of a strong selective pressure from environement and host plant. However, since the 16S-23S ITS marker may be considered as neutral, such hypothesis implies that the same genotype has always been selected in all populations. This also implies a lack of recombination between ITS and genes under selection. Finally, insular bacteria are closely related to the previously published *Bradyrhizobium* sp. genospecies V that was isolated from *Faidherbia albida* in Senegal. This last observation could be related to a long distance dispersal acted by atmospheric currents.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the French Ministry MEDD (Ministère de L'Ecologie et du développement Durable) for the financial support to implement the *Pterocarpus officinalis* project. This work was supported financially by the Guadeloupe Archipelago Region and the Social European Fund. We are very grateful to colleagues at the University of Antilles-Guyane Rousteau Alain,

Imbert Daniel and to Aide Mitchell, as well as Rivera-Ocasio E of University of Puerto Rico, Río Piedras for assistance in collecting samples, and to A. Vaillant and M. Poitel at CIRAD for their technical assistance in the laboratory.

REFERENCES

- Aguilar, O. M., O. Riva, and E. Peltzer. 2004. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *PNAS* **101**:13548–13553.
- Bâ, A. M., R. Samba, S. Sylla, C. Le Roux, M. Neyra, A. Rousteau, D. Imbert, and A. Toribio. 2004. Caractérisation de la diversité des microorganismes symbiotiques de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses de Guadeloupe et Martinique. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* **59**:163-170.
- Bacon, P. 1990. Ecology and management swamp forest in the Guianas and Caribbean region. *Ecosystems of the World* 15. *Forested Wetlands* (eds Lugo AE, Brinson M, Brown S), pp. Elsevier, Amsterdam.:213-250.
- Barrett, S. C. H. 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* **351**:725-733.
- Barrios, E., and R. Herrera. 1994. Nitrogen cycling in venezuelan tropical seasonally flooded forest: soil nitrogen mineralization and nitrification. *Journal of Tropical Ecology* **10**:399-416.
- Chen, W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay, and P. Vandamme. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51**:1729-1735.
- Cintrón, B. B. 1983. Coastal freshwater swamp forests: Puerto Rico's most endangered ecosystem. A. E. Lugo Los bosques de Puerto Rico. Institute of Tropical Forestry, USDA 31,Forest Service, Rio Piedras P.R: 249-282.
- Denison, F., and T. Kiers. 2004. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes and Infection* **6**:1235-1239.
- Emerson, B. C. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular Ecology* **11**:951–966.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* **10**:1500-1508.
- Gomez, A. G.-M., SC, C. Collada, J. Climent, and L. Gill. 2003. Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and*

- Applied Genetics **107**:1123-1131.
- Graham, P. 1992. Stress tolerance in rhizobium and bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. Canadian Journal of Microbiology **38**:475-484.
- Griffin, D. W., C. A. Kellogg, V. H. Garrison, J. T. Lisle, T. Borden, C, and E. A. Shinn. 2003. Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust events. Aerobiologia **19**:143-157.
- Hirsch, A. M., M. R. Lum, and J. A. Downie. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so spécial? Plant Physiology **127**:1484-1492.
- Isard, S. A., and G. S.H. 2001. Flow of Life in the Atmosphere: An Airscape Approach to Understanding Invasive Organisms. Michigan State University Press:304 pp.
- Kellogg, C. A., D. W. Griffin, V. H. Garrison, K. K. Peak, N. Royall, R. R. Smith, and E. A. Shinn. 2004. Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa. Aerobiologia **20**:99–110.
- Koponen, P., P. Nygren, A. M. Domenach, C. Le Roux, E. Saur, and J. C. Roggy. 2003. Nodulation and dinitrogen fixation of legume trees in tropical freshwater swamp forest in French Guiana. Journal of Tropical Ecology **19**:655-666.
- Krasova-Wade, T., I. Ndoye, S. Braconnier, B. Sarr, P. de Lajudie, and M. Neyra. 2003. Diversity of indigenous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). African Journal of Biotechnology **2**:13–22.
- Leblond-Bourget, N., H. Philippe, I. Mangin, and B. Decaris. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence Analyses Reveal Inter- and Intraspecific *Bifidobacterium* Phylogeny. International Journal of Systematic Bacteriology:102-111.
- Maron, P.-A., D. P. H. Lejon, E. Carvalho, K. Bizet, P. Lemanceau, L. Ranjard, and C. Mougel. 2005. Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA fingerprinting and 16S rDNA clone library. Atmospheric Environment **39**:3687-3695.
- McKey, D. 1994. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of nitrogen-demanding lifestyle. Pp 211-229 in Sprent, J.L & McKey, D. (eds). Advances in legume systematics 5: the nitrogen factor. Royal Botanic Gradens, Kew.
- Moreira, F. M. S., M. Freitas Da Silva, and S. M. De Faria. 1992. Occurence of nodulation in legume species in Amazon region of Brazil. New Phytologist **121**:563-570.

- Moreira, F. M. S., K. Haukka, and J. P. W. Young. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brasil. *Molecular Ecology* **7**:889-895.
- Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the Beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**:948-950.
- Muller, F., A. Vaillant, A. M. Bâ, and J.-M. Bouvet. 2006. Isolation and Characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq. *molecular Ecology Notes* **6** 462–464.
- Muller, F., M. Voccia, A. M. Bâ, and J.-M. Bouvet. soumis en 2006 à Conservation Genetics Pattern of genetic diversity of *Pterocarpus officinalis* Jacq., a tree species distributed in Caribbean zones: implications for its conservation in islands.
- Müller, J., A. Wiemken, and T. Boller. 2001. Redifferentiation of bacteria isolated from *Lotus japonicus* root nodules colonized by *Rhizobium* sp. NRG234. *Journal of Experimental Botany* **52**:2181-2186.
- Parker, M. A. 2003. Genetic markers for analysing symbiotic relationships and lateral gene transfer in Neotropical bradyrhizobia. *Molecular Ecology* **12**:2447.
- Parker, M. A., J. L. Doyle, and J. J. Doyle. 2004. Comparative phylogeography of Amphicarpa legumes and their root-nodule symbionts in Japan and North America. *Journal of Biogeography* **31**:425–434.
- Prospero, J. M., E. Blades, G. Mathison, and R. Naidu. 2005. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia* **21**:1-19.
- Provorov, N. A. 1998. Review Article. Coevolution of rhizobia with legumes: Facts and hypotheses. *Symbiosis* **24**:337-368.
- Saur, E., I. Bonhème, P. Nygren, and D. Imbert. 1998. Nodulation of *pterocarpus officinalis* in the swamp forest of Guadeloupe (lesser Antilles). *Journal of Tropical Ecology* **14**:761-770.
- Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. San Francisco, Numerical taxonomy. Freeman.,573 p.
- Sprent, J. I. 1999. Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **2**:149-162.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* **24**:4876-4882.

- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Willems, A., A. Munive, P. de Lajudie, and M. Gillis. 2003. In Most *Bradyrhizobium* Groups Sequence Comparison of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer Regions Corroborates DNA-DNA Hybridizations. Systematic and applied microbiology **26**:203-210.
- ZAK, D., W. HOLMES, D. WHITE, A. D. PEACOCK, and D. TILMAN. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem fonction: are there any link? Ecology **84**:2042-2050.

Résultats complémentaires, sur la diversité des bactéries symbiotiques isolées à partir de nodules de *P.officinalis*

Mise en collection des souches isolées

Une colonie isolée de chaque culture pure sert à l'ensemencement d'un tube de milieu YM liquide. Au bout de quelques jours, on ajoute à la culture en phase de croissance exponentielle une solution de glycérol stérile à 60%, de façon à obtenir une concentration finale de 20 % de glycérol. Deux exemplaires de chaque isolat sont placés à -80°C dans des tubes Nunc. Une goutte de chaque mélange souche-glycérol est étalée sur boîte de YMA pour en contrôler la non-contamination.

Récapitulatif des souches isolées

Tableau 26: liste des souches de *Bradyrhizobium* isolées de nodules de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses en Guadeloupe, Martinique, Dominique, Guyane et Porto Rico. Les souches sont conservées à -80°C au LSTM

® Milieu salé > 15 g/l ; milieu peu salé < 8 g/l

Diversité des *Bradyrhizobium* par électrophorèse en champ pulsé

La comparaison des séquences ITS des bactéries insulaires a montré une très faible diversité (Muller, 2006). Face à ce résultat, nous avons décidé de nous tourner vers une technique de génotypage, non plus focalisée sur un locus, mais sur le génome entier. Une dizaine de souches bactériennes en provenance des différents sites échantillonnés, ont donc été testées en AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Cependant, contrairement aux souches guyanaises, il n'a pas été possible de discriminer de façon évidente les souches insulaires à l'aide de leurs profils AFLP. Afin de vérifier si cette absence de diversité était avérée pour les souches présentant des profils ITS identiques sur près de 500 pb, nous nous sommes penchés sur une technique de génotypage plus discriminante, à savoir la PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) (Schwartz & Cantor 1984). Cette technique, fait intervenir une digestion de l'ADN total à l'aide d'une endonucléase de restriction,

reconnaissant des sites de coupure "rares", générant un nombre restreint de fragments d'ADN dont la taille et le nombre sont caractéristiques de l'isolat étudié (Moulin, pers comm.). Le principe de cette électrophorèse consiste à changer l'orientation et/ou la polarité du champ électrique alternativement au cours du temps, afin de faciliter la migration de fragment d'ADN de grande taille (50 kb à quelques mégabases) dans le maillage formé par l'agarose du gel de migration. Cette technique est plus discriminante que ne peut l'être le séquençage, mais reste toute fois plus laborieuse et onéreuse à l'heure actuelle. L'utilisation de cette technique a montré que toutes les souches insulaires étudiées étaient génétiquement distinctes.

Matériels et méthodes

Pour le génotypage en champ pulsé, les « plugs » d'agarose contenant l'ADN génomique bactérien intact ont été digérés avec l'enzyme *SpeI*. L'électrophorèse a été réalisé avec un gel d'agarose à 1%, dans un tampon de TBE (Tris-borate-EDTA) à 0,5 M pendant 37,8 heures sous 6V/cm (CHEF-Mapper XA system; Bio-Rad).

Résultats et discussions

Toutes les souches insulaires, pourtant identiques sur la base de leurs séquences ITS, présentent des profils de restriction différents (Figure 27)

L'absence de diversité observée en comparant les séquences ITS des souches bactériennes insulaires est remise en question par le génotypage réalisé en PFGE. Dans la mesure où plusieurs séquences ITS peuvent cohabiter au sein d'un même génome bactérien, et que les recombinaisons génétiques par transferts de matériel génétique sont fréquentes chez les procaryotes, on peut s'interroger sur l'implication des amorces dans leur aptitude à amplifier préférentiellement une région ITS donnée.

Cependant, le séquençage de l'ITS reste une technique qui a fait ses preuves à de nombreuses reprises et ayant permis l'observation d'une importante diversité génétique au sein des souches continentales dans notre étude. On peut aussi donc

se poser la question dans le cadre du génotypage par le séquençage de la région ITS d'un seuil de détection inadapté à notre étude, sans pour autant remettre en question ni la diversité observée préalablement en milieu continental, ni la faible diversité des souches insulaires.

Il serait intéressant de compléter cette étude de diversité bactérienne par le biais de marqueurs spécifiques comme par exemple *nodZ*, *nolL*, et *noel* ou encore le génotypage systématique en PFGE. Dans tous les cas, les résultats de cette expérience ne nous laissent pas sans interrogations, et confortent l'importance du génotypage polyphasique.

Tableau 26.: Liste des souches de *Bradyrhizobium* isolées de nodules de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses en Guadeloupe, Martinique, Dominique, Guyane et Porto Rico.

Nom de la souche	Origine	Localisation	Date de prélèvement	Milieu
1844	Grande Ravine	Guadeloupe	14/03/2002	exondé
1846	Viard	Guadeloupe	11/02/2002	exondé
1847	Le Moule	Guadeloupe	14/03/2002	exondé
1848	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	2002	exondé
1849	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	2002	exondé
1850	Pointe à Retz	Guadeloupe	2002	exondé
1851	Port Louis	Guadeloupe	2002	exondé
1852	Rivière Bananier	Guadeloupe	11/02/2002	exondé
1854	Le Moule	Guadeloupe	14/03/2002	exondé
1855	Viard	Guadeloupe	11/02/2002	exondé
1856	Blain	Guadeloupe	10/05/2002	exondé
1857	Rivière Bananier	Guadeloupe	11/02/2002	exondé
1858	Pointe à Retz	Guadeloupe	10/05/2002	exondé
1859	Grande Ravine	Guadeloupe	14/03/2002	exondé
1860	Port Louis	Guadeloupe	2002	exondé
1862	Rivière Bananier	Guadeloupe	11/02/2002	exondé
1863	Rivière Bananier	Guadeloupe	11/02/2002	exondé
1864	Blain	Guadeloupe	10/05/2002	exondé
1866	Deshaises	Guadeloupe	11/02/2002	exondé
1868	Deshaises	Guadeloupe	2002	exondé
1873	Pointe à Retz	Guadeloupe	2002	exondé
BP 1.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 12.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 13.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 18.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 2.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 20.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 21.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 23.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 29.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 3.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 34.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 5.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 6.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 7.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 8.1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
BP 9.2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	avril 2003	exondé
D 12.1	India River	Dominique	novembre 2003	exondé
D 15.1	India River	Dominique	novembre 2003	exondé
D 19.2	India River	Dominique	novembre 2003	exondé
D 6.1	India River	Dominique	novembre 2003	exondé
D 6.2	India River	Dominique	novembre 2003	exondé
G 15.2	crique Alexandre Jacq	Guyane	novembre 2003	exondé
G 5.1	crique Alexandre Jacq	Guyane	novembre 2003	exondé
G 5.2	crique Alexandre Jacq	Guyane	novembre 2003	exondé
G 7.1	crique Alexandre Jacq	Guyane	novembre 2003	exondé
G 9.1	crique Alexandre Jacq	Guyane	novembre 2003	exondé

Nom de la souche	Origine	Localisation	Date de prélèvement	Milieu
guy 11.10.1	Parakou	Guyane	novembre 2003	exondé
guy 7.10.10	Parakou	Guyane	novembre 2003	exondé
guy 7.10.13	Parakou	Guyane	novembre 2003	exondé
LMO 12.2	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 17.1	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 19.1	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 2.1	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 20.1	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 20.2	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 3.2	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 4.2	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
LMO 9.1	Le Moule	Guadeloupe	avril 2003	exondé
M 1.1	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 12.2	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 13.1	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 16.1	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 1.3	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 1.2	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 1.1	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 6.1	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
M 8.1	Galion	Martinique	avril 2003	exondé
MG 12.2	Marie Galante	Guadeloupe	avril 2003	exondé
MG 17.1	Marie Galante	Guadeloupe	avril 2003	exondé
PR 1.2	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 1.3	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 11.1	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 12.2	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 12.3	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 13.2	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 13.3	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 16.1	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 16.2	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 16.3	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 18.1	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 19.2	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 2.2	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 2.3	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 20.1	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 20.3	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
PR 5.1	Porto Rico	Sabana Seca	avril 2004	exondé
DE 1.2	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 1.3	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 10.2	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 12.1	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 12.2	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 12.3	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 13.1	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 17.1	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
DE 19.2	Guadeloupe	Deshaines	avril 2003	exondé
OM6	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	09/03/2003	exondé et peu salé
OM5	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	09/03/2003	exondé et peu salé
OM2	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	09/03/2003	exondé et salé
OM3	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	09/03/2003	exondé et salé
OM1	Belle-Plaine (Abymes)	Guadeloupe	09/03/2003	exondé et salé

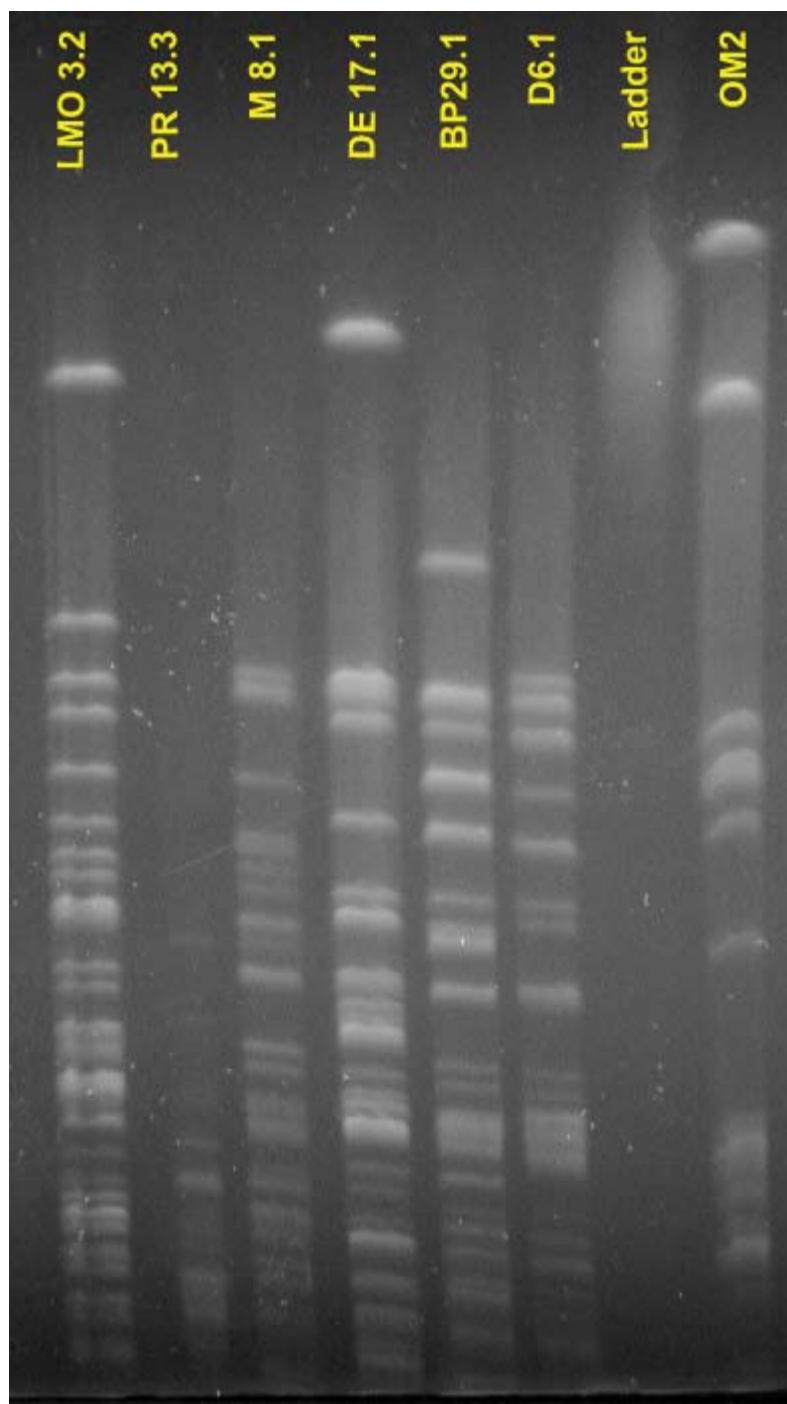


Figure 27. : Profils de digestion avec l'enzyme spel obtenus par électrophorèse en champ pulsé de souches bactériennes insulaires Les souches étudiées ici sont de gauche à droite : LMO3.2, PR13.3, M8.1, DE17.1, BP29.1, D6.1 et OM2. Le marqueur de taille (ladder) n'a pas rempli son rôle sans pour autant porter préjudice à l'information liée aux profils de digestion.

CHAPITRE 4 : Écologie des mycorhizes à arbuscules de *Pterocarpus officinalis* le long d'un gradient de salinité en forêt marécageuse

Introduction à la publication IV

Comme nous l'avons vu précédemment *P.officinalis* vit en symbiose avec des rhizobiums et plus particulièrement des *Bradyrhizobium*. Cependant, la vie symbiotique de *P. officinalis* ne se limite pas aux bactéries, puisque ce dernier est aussi colonisé par des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) (Bâ et al. 2004). Nous nous sommes donc intéressés à l'écologie de ces champignons mycorhiziens à arbuscules sous contraintes édaphiques (salinité et inondation) dans une forêt marécageuse à *P. officinalis*.

L'absence de spores dans les sols marécageux de la forêt de Belle Plaine (Abymes, Guadeloupe) n'a pas permis l'identification taxonomique des champignons mycorhiziens à arbuscules inféodés à *P. officinalis*. Les CMA sont présents uniquement sous forme de mycélium libre et/ou en symbiose avec *P. officinalis* dans les sols marécageux. La salinité semble avoir un impact important sur les CMA, puisque le potentiel mycorhizien du sol et le taux de colonisation des racines de *P. officinalis* ont diminué le long d'un gradient de salinité en saison sèche (2-26‰) et en saison humide (5-22‰). Cependant, les CMA de *P. officinalis* seraient tolérants jusqu'à 10‰ de sel.

Publication IV

Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient

L. Saint-Etienne, S. Paul, D. Imbert, M. Dulormne, F. Muller, A. Toribio, C. Plenchette, A.M. Bâ, 2006. *Forest Ecology and Management* 232: 86-89

Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient

L. Saint-Etienne^a, S. Paul^a, D. Imbert^a, M. Dulorme^a, F. Muller^a,
A. Toribio^b, C. Plenchette^{c,*}, A.M. Bâ^a

^a Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles et de la Guyane,
BP. 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^b Laboratoire de Mycologie-Flore Pathogène du Sol, URPV, Domaine de Duclos, INRA centre Antilles-Guyane,
F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France

^c Environment et Agronomie, UMR BGA, Institut National de la Recherche Agronomique, INRA,
17 rue Sully, 21065 Dijon Cedex, France

Received 13 December 2005; received in revised form 24 April 2006; accepted 17 May 2006

Abstract

Pterocarpus officinalis (Jacq.) is the dominant wetland legume tree species of the seasonally flooded swamp forests in Guadeloupe, Lesser Antilles. This tree is periodically exposed to saline and flooded soil conditions. We examined mycorrhizal soil infectivity (most probable number (MPN) values) and arbuscular mycorrhizal (AM) colonization of *P. officinalis* along the salinity gradient where the salt levels ranged from 26 to 2‰ and from 22 to 5‰ at the end of the dry and wet season, respectively. MPN values were higher in the dry season than in the wet season. They decreased when the salt levels increased whatever the season. AM colonization of *P. officinalis* was well developed (up to 50%) only within the low salinity levels (below 10‰) whatever the season. No spores were found in soil cores, suggesting that propagules were only mycelium pieces and/or root fragments of colonized *Pterocarpus* roots. These AM fungi may be adapted to salt stress and explain the maintenance of the high mycorrhizal inoculum potential in the *P. officinalis* swamp forest.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal colonization; Swamp forest; Salinity; Flooding; Guadeloupe

1. Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in wetland habitats are exposed periodically to anaerobic soils and high soil salinity (Bohrer et al., 2004; Carvalho et al., 2004). Since AMF require oxygen to thrive, stressful environments regularly flooded with salt water may be detrimental for their survival and infectivity. Nevertheless, some AMF are able to persist in flooded soils and to colonize wetland plants (Khan, 1993; Miller and Bever, 1999; Turner et al., 2000; Landwehr et al., 2002). More than 50% of the plant's population were colonized by AMF in some wetlands conditions (Ragupathy et al., 1990). One species, *Glomus geosporum*, is usually dominant in European salt marshes (Landwehr et al., 2002; Carvalho et al., 2004). These studies suggest fungal adaptation to salt and flood conditions. In

this respect, AMF possess propagules allowing long-term survival in soils and immediate opportunistic root colonization (Smith and Read, 1997). Spores, infected root fragments and extraradical mycelia are the main sources of inoculum potential in soils contributing to the infectivity of plants. The relative contribution of each type of propagules to plant root colonization is difficult to establish. Depending on fungal species, spore production and germination were affected by salinity and soil water levels (Miller and Bever, 1999; Carvalho et al., 2004). Le Tacon et al. (1986) reported that anaerobic conditions inhibited the germination of spores of *Glomus mosseae*, but that this effect was reversible upon exposure of the spores to air. The identity of the host plant was also known to be an important factor affecting density of AM propagules and sporulation (Smith and Read, 1997). However, extraradical mycelia and root fragments seemed to be relatively more important than spores for the initiation of plant colonization in wetlands, salt marshes and aquatic systems (Brown and Bledsoe, 1996; Carvalho et al., 2004).

* Corresponding author. Tel.: +33 380693032; fax: +33 380693262.

E-mail address: christian.plenchette@dijon.inra.fr (C. Plenchette).

In the present work, we studied the AM inoculum potential in swamp soils from a monospecific stand of the wetland legume tree *Pterocarpus officinalis*. This tree is useful for the study of AM soil infectivity because it grows along a gradient of salinity. This allowed us also to determine the effect of salinity on AM colonization, while keeping the host plant constant.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The *Pterocarpus* swamp forest covers 2600 ha of freshwater, coastal wetlands in Guadeloupe (Imbert et al., 2000). It is found mainly around the bay of the Grand cul-de-sac Marin, behind mangrove areas. The study site is located on the eastern side of the bay, in the Abymes coastal plain ($61^{\circ}30'N$, $16^{\circ}10'W$). At this site, the swamp forest is separated from the mangrove forest by a narrow strip (ca. 50 m-wide) of mainly herbaceous vegetation, dominated by the fern *Acrostichum danaefolium* and the liana *Rhabdadenia biflora*. Some stunted *Pterocarpus* trees, mostly dead, occur inside this ecotope zone. From the swamp forest edge inwards, tree height gradually rises from about 5 to 20 m and over. As the canopy rises, stem density decreases, whereas basal area increases. *P. officinalis* is the only tree species contributing to the forest canopy. Understorey species, like *Coccoloba venosa* and *Montrichardia arborescens*, are few and far between. The forest is flooded most of the year, depending on the duration of the rainy season. Water level may vary from place to place, due to *Pterocarpus* buttresses that create low mounds. The soil is clayey, soft and brownish in the upper 30 cm, denser and greyer below.

2.2. Sampling and measurements

The investigations were conducted along a transect starting from the seaward edge toward the inner part of the swamp forest. Sampling was made on three mature trees of *P. officinalis* in six plots ($3\text{ m} \times 3\text{ m}$) along a part of the transect that spanned an existing salinity gradient. The length of this part of the transect was approximately 170 m. Water-table level was assessed around each sampled tree by measuring water depth in comparison with ground surface. Pore-water salinity at 20 cm below ground level and salinity of above-ground standing water were measured using an ATAGO ATC-S, temperature-compensated hand refractometer (ATAGO Inc.,

Bellevue, WA, USA). Salinity and water depth measurements were made at the end of the dry and wet season.

For each plot, five soil cores (20 cm in depth; 7 cm in diameter) were taken around each mature tree, pooled per soil salinity level and stored at room temperature (20°C). The method chosen for mycorrhizal soil infectivity determination was the most probable number (MPN) method (Porter, 1979). The method involves cultivation of a test plant having a high mycorrhizal dependency (Plenchette et al., 1983) on a range of successive dilutions of the soil to be tested. Soil samples were air dried and sieved (2 mm) prior to disinfect a sub sample of each by autoclaving (115°C , 45 min). The remaining humidity was determined. Then, for each sample, non-disinfected (ND) and disinfected (D) soils were mixed together to obtain the following range of dilutions: 1, 1/4, 1/16, 1/64, 1/256 and 1/1024 (ND/D; w/w). Five replicates were made for each dilution. Soil (100 g) were placed in small pots then planted with a 2-week-old seedling of millet (*Pennisetum americanum* L.) for a 6-week growing period. Pots were placed in a controlled environment (24°C day/ 18°C night; relative humidity 80%; light intensity $112\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$). After 6 weeks the entire root system of each plant was gently washed, cleared and stained (Phillips and Hayman, 1970). Observation of colonization was made under a dissecting microscope $50\times$. One infection point was considered as sufficient to state that the plant was colonized. Calculation of MPN values were made as described by Sieverding (1991) according to Fisher and Yates (1948) and expressed per 100 g of dried soil.

The fine roots were randomly collected for each mature tree of *P. officinalis* (three replicates per tree), gently washed, cleared and stained (Phillips and Hayman, 1970). Roots were then cut into 1 cm pieces, mixed and placed on slides for microscopic observations at $250\times$ magnification (Brundrett et al., 1985). One hundred root pieces were observed per plant. The extent of AM colonization was expressed as a percentage of the number of mycorrhizal root pieces/number of non-mycorrhizal root pieces. Data of mycorrhizal colonization were subjected to one-way analysis of variance, and mean values were compared using Newman–Keuls multiple range tests (Gagnon et al., 1989). Data of mycorrhizal colonization were transformed by arcsin (square root) before analysis.

3. Results

The salinity gradient ranged from 26 to 2% and from 22 to 5‰ at the end of the dry and wet season, respectively (Tables 1

Table 1

Soil salinity, mycorrhizal soil infectivity (MPN and confident limits) and mycorrhizal colonization of *P. officinalis* at the end of the dry season

Plots	Salinity ‰ (0–20 cm)	Water depth (cm)	MPN* (100 g)	Confident limits $p < 0.05$	Colonization** (%)
1	26	4	75 a	35–160	14.5 a
2	20	3	150 a	70–320	29.4 b
3	15.5	21	560 b	262–1196	47.5 c
4	10	-12	2400 bc	1123–5126	66.0 d
5	3	-3	3402 c	1592–7266	76.9 e
6	2	-7	3800 c	1779–8166	82.8 e

* Values followed by the same letters are not significantly different (confident limits, $p < 0.05$).

** Values followed by the same letters are not significantly different (Newman–Keuls, $p < 0.05$).

Table 2

Soil salinity, mycorrhizal soil infectivity (MPN and confident limits) and mycorrhizal colonization of *P. officinalis* at the end of the wet season

Plots	Salinity (%) (0–20 cm)	Water depth (cm)	MPN* (100 g)	Confident limits $p < 0.05$	Colonization** (%)
1	22	16	20 a	9–42	22.1 a
2	15	15	31 a	15–67	40.3 b
3	13.5	33	90 bc	42–191	48.8 b
4	8	0	1157 d	542–2472	65.1 c
5	3	9	688 d	322–1469	68.9 c
6	5	5	301 cd	141–644	75.1 c

* Values followed by the same letters are not significantly different (confident limits, $p < 0.05$).** Values followed by the same letters are not significantly different (Newman–Keuls, $p < 0.05$).

Table 3

Correlation coefficients (r) between mycorrhizal soil infectivity (MPN values), soil salinity (% Na^+) and mycorrhizal colonization of roots (% AM colonization)

	Dry season			Wet season		
	MPN	S	AM (%)	MPN	S	AM (%)
MPN	–0.96*	0.95*		–0.86*	0.75*	
S		–0.99*			–0.97*	

* Significant ($p < 0.05$).

and 2). There was not an evident flooding gradient in wet and dry seasons in the *P. officinalis* swamp forest (Tables 1 and 2).

Spores were not found in the soil samples collected during the dry and wet seasons (Tables 1 and 2). Nevertheless, AMF were present in the root samples of *P. officinalis*, whatever the salt level (Tables 1 and 2). The higher AM colonization (82–75%) was recorded for the lowest salt level (2–5%) (Tables 1 and 2). AM colonization was greater to 50% until the salt levels of 8 and 10% were reached in wet and dry seasons, respectively. MPN values due to mycelium and root fragments also decreased as salt level increased (Tables 1 and 2). However, MPN values were higher in the dry season than in the wet season.

Significant negative correlations were obtained between the salt levels and the MPN values both in wet and dry seasons (Table 3). MPN values and AMF colonization were positively correlated in dry season (Table 3). Whatever the season, colonization percentage was negatively correlated with salinity level (Table 3, Fig. 1).

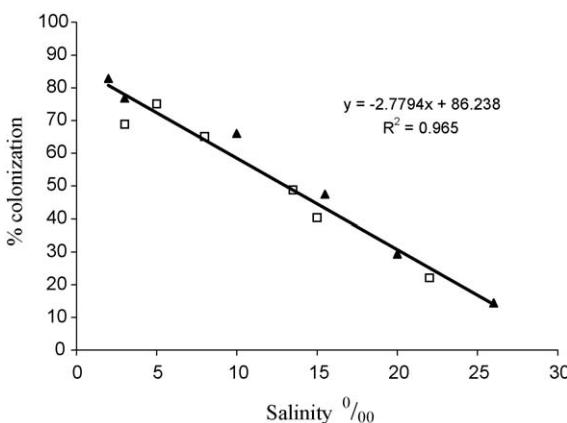


Fig. 1. Relationship between salinity level and development of AM colonization. (□) Dry season; (▲) wet season.

4. Discussion

Salinity has been shown to be an important factor influencing AM colonization of *P. officinalis* and fungal inoculum potential in swamp soils. AM colonization was indicated by the presence of aseptate hyphal coils and vesicles as *Paris*-type mycorrhizas (Bâ et al., 2004). Surprisingly, no spores were found in sieved soil samples collected during the dry and wet seasons. Since spores were absent, we conclude that the infection units and colonization of roots were due to mycelium and/or root fragments. We do not know the relative proportion of infection units and AM colonization derived from mycelium or root fragments. Furthermore, it is not clear whether the absence of spores in swamp soils was due to the toxic levels of minerals and/or to variations of depth water in dry and wet seasons. Some studies indicate that water depth is an important factor determining the distribution of spore species along a dry to wet gradient (Miller and Bever, 1999). The overall trend was for fewer spore species in wetter sites than in drier sites. Other studies suggest that soils from salt marshes contain spores of AMF in high numbers, whereas reduction of spore germination at water levels above field capacity may be related to the low tolerance of AMF to hypoxic conditions (Landwehr et al., 2002; Carvalho et al., 2004).

We found evidence for potential adaptation of native AMF to salt swamp soils and for the ability of AM propagules to spread into the roots. Indeed, AMF colonization was greater to 50% until the salt level of 8% was reached in dry and wet seasons and decreased in both seasons as salt level increased. Since AM colonization was already recorded on wetlands plants (Bohrer et al., 2004), some results were unexpected at very high salinity levels (Brown and Bledsoe, 1996). Our results suggest that AMF were well adapted to stressful salt swamp soils. The absence of spore in sieved swamp soils did not permit conclusions as to the taxonomy of these AMF. PCR with taxon-specific primers have been used to identify AMF within colonized roots (Landwehr et al., 2002). We plan to incorporate such techniques in our future work.

AM colonization did not vary significantly from wet to dry season, whereas the MPN values did. One possible explanation is that fungi may endure prolonged exposure to salt and flooding by spreading inside the *Pterocarpus* roots, whereas extraradical mycelium and root fragments in soils may not. In this respect, roots of *P. officinalis* would be well aerated due to aerenchymatous tissue, adventive roots and buttress lenticels.

Brown and Bledsoe (1996) observed AMF in the aerenchymatous tissue of salt marsh plants, suggesting that AMF are adapted to life in oxygen-deficient soils. MPN values were mainly higher than those recorded in other tropical soils, i.e., 10 propagules/100 g for a lowland wet forest in Costa Rica (Fisher et al., 1994) or 1–100 propagules/100 g for soils used for intensive banana cultivation in Martinique (Declerck et al., 1999). This suggests that *P. officinalis* may be considered as a high mycorrhizal dependent tree which favor AM fungal development. The high mycorrhizal soil infectivity could be also a real potential for the traditional culture of taro in the *Pterocarpus* swamp forests (Saur and Imbert, 2003). From an ecological point of view, AM soil infectivity and seasonal dynamics of AM colonization should be considered further to better assess the role and the distribution of AMF in the *Pterocarpus* swamp forests.

Acknowledgements

We thank the GIS ECOFOR and the Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable (grant no. 020000118) for their financial support. We thank also A. Roustea and N. Tromas for their help during the sampling.

References

- Bâ, A.M., Samba, R., Sylla, S.N., Le Roux, C., Neyra, M., Roustea, A., Imbert, D., Toribio, A., 2004. Caractérisation de la diversité des microorganismes symbiotiques de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses de Guadeloupe et de Martinique. Rev. Ecol. 59, 163–170.
- Bohrer, E.K., Friese, C.F., Amon, J.P., 2004. Seasonal dynamic of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. Mycorrhiza 14, 329–337.
- Brown, A.M., Bledsoe, C., 1996. Spatial and temporal dynamics of mycorrhizas in *Jaumea carnosa*, a tidal saltmarsh halophyte. J. Ecol. 84, 703–715.
- Brundrett, M.C., Piche, Y., Peterson, R.L., 1985. A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. Can. J. Bot. 63, 184–194.
- Carvalho, L.M., Correia, P.M., Martins-Louçao, A., 2004. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh. Mycorrhiza 14, 165–170.
- Declerck, S., Plenchettet, C., Risede, J.M., Strullu, D.G., Delvaux, B., 1999. Estimation of the population density of arbuscular mycorrhizal fungi in soils used for intensive banana cultivation in Martinique fruits. Fruits 54, 3–9.
- Fisher, R.A., Yates, F., 1948. Statistical Tables for Biological Agriculture and Medical Research, sixth ed. Hafner Publ. Comp., Davien.
- Fisher, C.R., Janos, D.P., Perry, D.A., Linderman, R.G., 1994. Mycorrhiza inoculum potentials in tropical secondary succession. Biotropica 26, 369–377.
- Gagnon, J., Haycock, K.A., Roth, J.M., Feldman, D.S., Finzer, W.F., 1989. Abacus Concepts SuperAnova: Les Modèles Linéaires Généralisés. Abacus concepts, Inc., Berkeley, CA, USA.
- Imbert, D., Bonhème, I., Saur, E., Bouchon, C., 2000. Floristics and structure of the *Pterocarpus officinalis* swamp forest in Guadeloupe, Lesser Antilles. J. Trop. Ecol. 16, 55–68.
- Khan, A.G., 1993. Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New South Wales, Australia. Mycorrhiza 3, 31–38.
- Landwehr, M., Hildebrandt, U., Wilde, P., Nawrath, K., Toth, T., Biro, B., Bothe, H., 2002. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. Mycorrhiza 12, 199–211.
- Le Tacon, F., Skinner, F.A., Mossé, B., 1986. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Gerdemann and Trappe) under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. Can. J. Bot. 29, 1280–1285.
- Miller, S.P., Bever, J.D., 1999. Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in stands of the wetland grass *Panicum hemitomon* along a wide hydrologic gradient. Oecologia 119, 586–592.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55, 158–161.
- Plenchette, C., Fortin, J.A., Furlan, V., 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I: Mycorrhizal dependency under field conditions. Can. J. Bot. 70, 199–209.
- Porter, W.M., 1979. The most probable number method for numerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Aust. J. Soil Res. 17, 515–519.
- Ragupathy, S., Mohankumar, V., Mahadevan, A., 1990. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in tropical hydrophytes. Aquat. Bot. 36, 287–291.
- Saur, E., Imbert, D., 2003. Traditional monoculture of taro (*Colocasia esculenta*) in the swamp forest of Guadeloupe West Indies. Bois For. Trop. 277 (3), 85–89.
- Sieverding, E., 1991. Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. GTZ, Germany, 371 pp.
- Smith, S.E., Read, D.J. (Eds.), 1997. Mycorrhizal Symbiosis. second ed. Academic Press, San Diego, London.
- Turner, S.T., Amon, J.P., Schneble, R.M., Friese, C.F., 2000. Mycorrhizal fungi associated with plants in ground-water fed wetlands. Wetlands 20, 200–204.

Chapitre 5 : Adaptation des symbioses fixatrices d'azote et mycorhiziennes de *Pterocarpus officinalis* à l'inondation

Introduction à la publication V

Dans son habitat naturel, *P. officinalis* et ses microorganismes associés sont soumis à l'inondation pendant une partie de l'année. Nous avons étudié le rôle de *Bradyrhizobium* sp. et de *Glomus intraradices* sur la tolérance à l'inondation de *P. officinalis* en serre (Fougnies et al. 2006, soumis). *P. officinalis* a poussé mieux en milieu inondé qu'en milieu exondé indépendamment de l'inoculation. L'apparition de racines adventives, d'aérenchymes et de lenticelles a été tout à fait remarquable sur la partie submergée des tiges. Les plantules de *P. officinalis* ont donc développé des mécanismes d'adaptation à l'inondation comparables à ceux des plantes aquatiques (Liao & Lin, 2001). Chez les plants inoculés, l'inondation a aussi induit la formation de nodules caulinaires et de mycorhizes à arbuscules sur les racines adventives. Ce résultat est original car c'est la première fois que des nodules de tiges et des mycorhizes à arbuscules de racines adventives sont observés chez une légumineuse arborescente. L'inoculation avec la souche *Bradyrhizobium* sp. n'a pas d'effet bénéfique sur la biomasse totale du *Pterocarpus* notamment en milieu inondé malgré l'activité fixatrice d'azote (ARA) dans les nodules et l'acquisition de l'azote dans les feuilles. La souche *G. intraradices* s'est révélée, par contre, efficace sur la biomasse totale des *P. officinalis* grâce à une colonisation racinaire tout à fait remarquable en milieu inondé. Cette colonisation racinaire par le champignon s'est aussi traduite par une augmentation du phosphore dans les feuilles. L'oxygénation des parties submergées de la tige au travers des lenticelles, des racines adventives et des aérenchynes, pourrait favoriser la colonisation remarquable du système racinaire de *Pterocarpus* par le champignon mycorhizien à arbuscules. La double inoculation n'a cependant pas permis de mettre en évidence une synergie d'action des deux symbiotes sur la croissance et la fixation d'azote des *Pterocarpus*.

Publication V

**Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation
improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis*
Jacq. seedlings**

L. Fougnies, S. Renciot, F. Muller, C. Plenchette, Y. Prin, S.M. de Faria, J.M. Bouvet,
S.Nd. Sylla, B. Dreyfus, A.M. Bâ (2006). *Mycorrhiza* (sous presse)

Mycorrhiza (sous presse)

Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings

L. Fougnies¹, S. Renciot¹, F. Muller^{1, 2, 3}, C. Plenchette⁴, Y. Prin², S.M. de Faria⁵, J.M. Bouvet³, S.Nd. Sylla⁶, B. Dreyfus², A.M. Bâ^{1, 2*}

¹ Laboratoire de biologie et physiologie végétales, Faculté des sciences exactes et naturelles, Université Antilles-Guyane, BP. 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France ; ² Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes, UMR 113 IRD/INRA/AGRO-M/CIRAD/UM2, TA10/J, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex, France ; ³ Laboratoire de génétique forestière, CIRAD-Forêt, TA 10/C, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex, France ; ⁴ INRA, UMR BGA, 17 rue Sully, 21065 Dijon, Cedex France ; ⁵ CNPAD/EMBRAPA, Seropédica Itaguaí RJ 23851-970 by Embrapa/CNPAB Seropédica RJ 23890-000 Brazil ; ⁶ Laboratoire commun de microbiologie ISRA/IRD/UCAD, centre de Bel-Air, BP. 1786, Dakar, Sénégal.

* Corresponding author : A. M. Bâ, Fax : 0590 93 87 20, Tel : 0590 93 86 82, E-mail : amadou.ba@univ-ag.fr

Abstract

Pterocarpus officinalis (Jacq.) seedlings inoculated with the arbuscular mycorrhizal (AM) fungus, *Glomus intraradices*, and the strain of *Bradyrhizobium* sp. (UAG 11A), were grown under stem-flooded or non-flooded conditions for thirteen weeks, following 4 weeks of non-flooded pre-treatment under greenhouse conditions. Flooding of *P. officinalis* seedlings induced several morphological and physiological adaptive mechanisms including formation of hypertrophied lenticels, aerenchyma tissue and production of adventitious roots on submerged portions of the stem. Flooding also resulted in an increase in collar diameter, and leaf, stem, root and total dry weights, regardless of inoculation. Under flooding, arbuscular mycorrhizas were well developed on root systems and adventitious roots as compared with inoculated root systems under non-flooding condition. Arbuscular mycorrhizas made noteworthy contributions to the flood-tolerance of *P. officinalis* seedlings by improving plant growth and P acquisition in leaves. We report here the novel occurrence of nodules connected vascularly to the stem as well as nodule and arbuscular mycorrhizas on adventitious roots of *P. officinalis* seedlings. Root nodules appeared more efficient fixing N₂ than stem nodules were. Beneficial effect of nodulation in terms of total dry weight and N acquisition in leaves was particularly noted in seedlings growing under flooding conditions. There was no additive effect of arbuscular mycorrhizas and nodulation on plant growth and nutrition in either flooding treatment. The results suggest that the development of adventitious roots, aerenchyma tissue and hypertrophied lenticels may play a major role in flooded tolerance of *P. officinalis* symbiosis by increasing oxygen diffusion to the submerged part of the stem and root zone, and therefore contribute to plant growth and nutrition.

Keywords : Arbuscular mycorrhizas, *Glomus intraradices*, Mycorrhizal adventitious roots, *Bradyrhizobium*, Stem nodules

Introduction

Much of the wetlands is subject to flooding due to the presence of shallow water tables and a decrease in surface water infiltration (Barrett-Lennard 2003). Flooding causes hypoxia or anoxia in soils because of the low solubility and diffusivity of oxygen in water and the rapid use of dissolved oxygen by microorganisms and roots. Therefore, there is a decrease in the mineralization of organic matter and an increase in the denitrification (Barrios and Herrera 1993). Moreover, heavy leaching of soils, brought about by seasonal flooding, contributes to the shortage of available N and P. A number of wetland plants are nodulated legumes (Walter and Bien 1989; Moreira et al. 1992; Loureiro et al. 1995; Saur et al. 1998; James et al. 2001; Koponen et al. 2003) that also associates with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi (Sanchez-Diaz et al. 1990; Carvalho et al. 2003; Bâ et al. 2004). While the occurrence of AM fungi in wetland is well documented (Bohrer et al. 2004; Carvalho et al. 2004 ; Saint-Etienne et al. 2006), their importance and function are limited and often contradictory. It is not clear whether flooding modifies AM effects, as some results show an improvement in growth and P nutrition over non-colonized plants (Wigand and Stevenson 1997 ; Osundina 1998 ; Miller and Sharitz 2000 ; Muok et al. 2006 ; Neto et al. 2006), some have shown a decrease (Stevens et al. 2002), and others did not detect a clear relationship (Hartmond et al. 1987). The lack of external input of N in ecosystems increases the demand for biological nitrogen fixation (Dommergues et al. 1999). Nodulated legumes can contribute significantly to the N-balance of tropical wetlands and rainforests (Roggy et al. 1999 a,b ;

Koponen et al. 2003; Diabaté et al. 2005). Legumes generally require P from mycorrhizas for their nodule formation, nitrogen fixation and growth (Dommergues et al. 1999 ; Vance 2001). However, little is known about the interactions between AM fungi and nitrogen fixing bacteria, in legumes growing in wetland ecosystems.

Pterocarpus officinalis (Jacq.) (Fabaceae) is the dominant wetland tree species of the seasonally flooded swamp forests in the Caribbean basin (Eusse and Aide 1999 ; Imbert et al. 2000 ; Muller et al. 2006). It covers large areas of the coastal floodplain, and individual trees occur along rivers and in the mountains. The establishment and population maintenance of *P. officinalis* are affected by the variations in salinity and hydrology as well as differences in soil microtopography in swamp forests (Alvarez-Lopez 1990; Eusse and Aide 1999). This tropical wetland tree species forms bradyrhizobial nodules and arbuscular mycorrhizas on lateral roots of buttresses both above and below the water table (Saur et al. 1998; Bâ et al. 2004; Saint-Etienne et al. 2006). Alvarez-Lopez (1990) suggested that *P. officinalis* cannot establish seedlings under flooding conditions, because rooting of germinated fruit did not occur in water over 3-4 cm deep. If flooding persists, only germinated seeds, transported by water movement to higher elevations, may survive (Alvarez-Lopez 1990). We hypothesized that nodulation and arbuscular mycorrhizas could improve the performance of *P. officinalis* seedlings under flooding. Two questions are addressed in the present study: (1) are *P. officinalis* seedlings adapted to flooding? (2) do arbuscular mycorrhizas and N₂-fixing nodules increase the performance of *P.*

officinalis seedlings under flooding?

Materials and methods

Fungal and bacterial inocula

The AM fungus, *Glomus intraradices* Schenck & Smith (DAOM 181602, Ottawa, Agricultural Herbarium), was propagated on leeks (*Allium porrum* L.) growing on Terragreen™ substrate for 12 weeks on a calcined clay (Oil-Dri US-special Ty/IIR, Oil-Dri Company, Chicago, USA) (Plenchette et al. 1996) under greenhouse conditions. The leek plants were uprooted, their roots gently washed and cut into 0.5 cm long pieces. Non-AM leek roots, prepared as above, were used for the control treatment.

Bradyrhizobium sp. (UAG 11 A) strain was isolated from a root nodule collected during the dry season from a mature *P. officinalis* tree growing in the swamp forest of Port Louis in Guadeloupe, Lesser Antilles (Bâ et al. 2004). The bacterial inoculant consisted of a 10-day-old pure culture grown on liquid yeast extract-mannitol medium (Vincent 1970).

Seed germination

Pods of *P. officinalis* were collected along the river in the swamp forest of Grande Ravine in Guadeloupe. Pods were shelled and seeds were surface sterilized with 3% sodium hypochlorite (w/w) for 10 min. They were then rinsed several times in sterile water and germinated in sterile vermiculite at 25°C in the dark. The germinated seeds were moved into pots when tap roots were 2-3 cm long.

Experimental design

The potting substrate was a mixture of heat-sterilized pouzzolane (crushed volcanic rock with particle size averaging 2 mm) and vermiculite (4:1; v/v). The nutrient content (in ppm) of the heat-sterilized crushed volcanic rock was as follows: 4.28 K, 15.67 Na, 6.36 Ca, 4.99 Mg, 1.26 NH₄⁺, 2.75 NO₃⁻ (H₂O-extractable), 0.12 Olsen-P, pH (H₂O) = 8.41, pH (KCl) = 7.2, 0.11 g/l total salt and electrical conductivity 0.036 mS/cm. Black pots (22 cm deep, 9 cm diameter) were filled with the substrate to within 4 cm below the rim. Soil leakage was prevented by placing a wad of polyester fiber at the bottom of each pot.

The seedlings were transplanted into pots and inoculated with *Bradyrhizobium* sp. alone, *G. intraradices* alone or with both microbial partners. A crude inoculum of 0.35 g of fresh leek roots colonized by *G. intraradices* (Gi) (with about 250 vesicles cm⁻¹) was placed in a hole of the substrate close to the seedlings root system, or 0.35 g of non-AM leek roots for the controls. Bradyrhizobial inoculation was then performed on seedlings by spreading 5 ml (10⁹ bacterial cells ml⁻¹) of a suspension of *Bradyrhizobium* sp. (Br) on tap root or 5 ml of the culture medium without bacteria for the controls. All the plants were grown under well-watered conditions without nutrients for 4 weeks in a shaded greenhouse receiving approximately 280 W m⁻² between February and June 2003, at 24°C-34°C with a day-length of about 12 h. Four weeks after transplanting, half of the pots went through a process of flooding. Seedlings were flooded every other day with tap water, so as to maintain water level 3 cm above the soil surface, in order to replace evaporated and/or transpired water in pots without drainage holes. Non-

flooded seedlings were watered every other day to reach the field capacity in pots with drainage holes. The pots were arranged in a completely random 4 x 2 factorial design comprising eight treatments: (1) flooded *Gi*, (2) flooded *Br*, (3) flooded *Gi* plus *Br*, (4) flooded non-inoculated, (5) non-flooded *Gi*, (6) non-flooded *Br*, (7) non-flooded *Gi* plus *Br*, (8) non-flooded, non-inoculated. Each treatment consisted of ten replicates. The plants were supplied each month with 50 ml of Long Ashton's nutrient solution (Hewitt 1966) without P, and N. Treatments were maintained for 13 weeks after flooding was performed.

Seedling measurements and nutrient analysis

Thirteen weeks after flooding, the number of adventitious roots was assessed by counting the roots emerging from the epicotyl. Nodules were collected separately from root and stem (including adventitious root nodules) and counted.

An acetylene reduction assay (ARA) was performed on ten freshly detached nodules randomly collected on roots or stems, thirteen weeks after flooding was performed. Nodules were immediately sealed in serum-capped vials, filled with 10% acetylene (C_2H_2) in air, and incubated at laboratory temperature for 1 h. Then, gas aliquots of 10 ml were removed from the vial and injected into a "Vacutainer" for storage. Ethylene (C_2H_4) and acetylene concentrations of the sample were analyzed using flame ionization in a Hewlett Packard 5890 II gas chromatography. The ARA results were considered as positive when the average C_2H_4 concentration after incubation with nodule was more than 1 mmole/g of dry nodule/h. Control root samples without nodules did not show concentrations above this value.

Nodules were dried at 80°C for 7 days and weighed after each assay.

Height, collar diameter and dry weight (7 days at 80°C) of leaves, shoots, roots, adventitious roots and the remaining stem and root nodules were evaluated. AM fungal colonization of roots and adventitious roots was also measured. The roots were randomly collected for each seedling, gently washed, cleared and stained (Phillips and Hayman 1970). Roots were then cut into 1 cm pieces, mixed and placed on slides for microscopic observations at 250 x magnification (Brundrett et al. 1985). Hundred root pieces were observed per plant. The extent of AM colonization was expressed as a percentage of the number of mycorrhizal root pieces / the number of non-mycorrhizal root pieces.

After drying, ground leaf samples were mineralized through heating at 500°C and digested in hydrochloric acid for determination of N and P. The total N contents of leaves were assessed using a Technicon autoanalyser. P was determined by colorimetry with chain in continuous flow (Technicon) according to Novozamsky et al. (1983).

Microscopy

Nodule-bearing stem portions were cut from plants, fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4°C, and rinsed in the same buffer. Thick sections (100µm thick) of whole nodules plus the bearing stem were obtained using a Vibratome (Leica, France), cleared in sodium hypochloride and observed under an Olympus SZH stereomicroscope.

For thin sections, samples were post-fixed for 1 h in 2% osmium

tetroxide and rinsed in distilled water. They were dehydrated through an ethanol series followed by three washes in pure ethanol, infiltrated by a resin series of ethanol-Spurr and then embedded in 100% Spurr resin. Polymerization took place at 70°C for 48 h. Approximately 0.5-1 mm thick sections were stained with 0.05% toluidine blue O in 1% borax and examined using a Leitz Ortholux light microscope.

Statistical analysis

All data were subjected to a two-way analysis of variance, and mean values were compared using Newman-Keuls's multiple range test (Gagnon et al. 1989). The mean number of nodules and the percentages of mycorrhizal colonization were calculated from arc sin (square root) transformed data.

Results

After thirteen weeks of flooding, hypertrophied lenticels and aerenchyma (not shown) tissue were observed on the submerged portion of the stem above the soil line (Fig. 1A). Few thick, white, elongated and branched adventitious roots had grown from stems (Fig. 1A).

Serial thick sections of stem nodules (Fig 1B) clearly reveal the direct link of the peripheral nodular vascularization to the stem vascular bundles. Numerous fixation zones are visible in the nodule with cells densely filled with bacteroids (Fig 1C).

Inoculated treatments produced significant effects on nearly all growth and mineral acquisition traits (Table 1). Flooding treatments had no significant effect on root and root nodule dry matter, number of root nodules, nitrogen fixation in root nodules, N and

P in leaves. Interactions between inoculation and flooding were significant for height, stem dry matter, number of root and stem nodules, stem nodule dry matter, AM colonization and nitrogen fixation in stem nodules.

Inoculated treatments did not increase number and dry weight of adventitious roots (Tables 1 and 2). Collar diameter, leaf, stem and total dry weights were generally higher under flooding than non-flooding (Table 2). *Bradyrhizobium* alone enhanced total biomass only under non-flooding. By contrast, *G. intraradices* alone stimulated total biomass under both flooding and non-flooding. There was no additive effect of *Bradyrhizobium* and *G. intraradices* on plant growth. However, *G. intraradices* alone or with *Bradyrhizobium* appeared to be more effective in increasing total biomass of *Pterocarpus* seedlings, particularly under flooding.

A few nodules were observed on roots of control plants (Table 3). However, they did not fix nitrogen efficiently when compared with inoculated treatments (Table 4). Number, dry weight and nitrogen fixation of root nodules were nearly the same in plants inoculated by *Bradyrhizobium* sp. under both flooding and non-flooding (Tables 3 and 4).

No AM fungal colonization was noted in roots and adventitious roots of control plants (Table 3). AM structures (vesicles and hyphal coils) were found both flooded and non-flooded. *Pterocarpus* plants grown under flooding had relatively high AM fungal colonization as compared to inoculated plants under non-flooding. Elongated adventitious roots also were well colonized by *G. intraradices* as they penetrated into the flooded soil (Fig

1D, Table 3).

Nodules formed on submerged stems and adventitious roots of flooded seedlings, and were able to fix N₂ (3-4 mmoles C₂H₄/h/g nodule dry weight) (Table 4). Root nodules formed also on both non-flooded and flooded seedlings, and were capable of fixing N₂ (7-9 mmoles C₂H₄/h/g nodule dry weight). Nitrogenase activity was lower in stem nodules than in root nodules of seedlings inoculated by *Bradyrhizobium* under flooding. There was no difference in nitrogen-fixing root nodules of inoculated *P. officinalis* seedlings by *Bradyrhizobium* both under flooding and non-flooding (Table 4). The concentrations of N in leaves of plants inoculated by *Bradyrhizobium* compared with non-inoculated plants showed that nitrogen-fixing root nodules were similarly efficient both under flooding and non-flooding. Moreover, *G. intraradices* significantly contributed to P acquisition in seedlings both under flooding and non-flooding. Nevertheless, P acquisition did not improve nitrogen-fixing stem and root nodules of *Pterocarpus* seedlings (Table 4).

Discussion

Flooding induced several physiological and morphological changes in *P. officinalis* seedlings including formation of hypertrophied lenticels, aerenchyma tissue and adventitious roots on submerged portions of the stem. Flooded plants grew overall better than non-flooded ones regardless of inoculation. These results suggest that *P. officinalis* seedlings can endure thirteen weeks flooding by developing some adaptive mechanisms. The high flooding tolerance of some trees has been mainly attributed to the production of adventitious roots that play a major role in water absorption

and stomatal opening (Gomes and Kozlowski 1980; Crawford 1982; Liao and Lin 2001; Entry et al. 2002; Carter et al., 2005). However, we did not measure the activity of adventitious roots in the present study.

Arbuscular mycorrhiza and root nodules were formed during the first 4 weeks when *Pterocarpus* seedlings were watered to near field capacity. This means that we have in part assessed the proprieties of mycorrhizas and nodules already established and those of new arbuscular mycorrhizas and nodules formed under flooding. These symbiotic associations appeared to have been maintained after the substrate was flooded. Since AM fungi require oxygen to thrive, stressful regularly flooded environments may be detrimental to their survival and infectivity (Smith and Read 1997). Nevertheless, evidence that the AM fungus remained viable under flooding was provided by the increase in the proportion of colonized root and P acquisition in leaves of *P. officinalis* seedlings. The increase in AM colonization with flooding in seedlings suggests a direct relation between flooding and AM colonization. This can be explained by the development of lenticels, aerenchymatous tissue and adventitious roots on the submerged part of the stem that could facilitate oxygen transport to support newly colonized roots. This is congruent with reports for salt marsh plants colonized by AM fungi (Brown and Bledsoe 1996 ; Carter et al. 2005 ; Neto et al. 2006). Mycorrhizal *Casuarina equisetifolia* seedlings were better adapted to flooding than non-inoculated seedlings because the greater development of adventitious roots and lenticels increased oxygen availability and therefore AM colonization of plants (Osundina 1998).

Accumulation of acetaldehyde, a highly toxic intermediate in ethanol formation, in roots has been suggested as the main factor responsible for flooding injury in flood-sensitive species (Osundina 1998; Rutto et al. 2002). Adventitious roots and lenticels may contribute to root aeration and ethanol removal in flood-tolerant species (Crawford 1982; Liao and Lin 2001). AM colonization also contributed to suppress ethanol accumulation in the roots of peach seedlings (Rutto et al. 2002). Some studies have also suggested that once AM colonization has taken place, the AM association can endure prolonged exposure to flooding (Miller and Sharitz 2000; Neto et al. 2006). The AM symbiosis seem to have, like flooding, a stressful effect on *Aster trifolium* at an early stage of plant development (Neto et al. 2006). Once the AM symbiosis was established, the better tolerance of AM *A. trifolium* plants to flooding was mediated through an improvement of the osmotic adjustment by accumulating soluble sugars and proline in plant tissues (Neto et al. 2006).

Flooding induced nodules both on adventitious roots arising from stems as well as on the stems themselves. Stem nodules formed only on submerged parts of flooded seedlings to within 1 cm of the soil surface, and flooding appeared essential for their formation. It is clear that, in flooding condition, *P. officinalis* seedlings formed true stem nodules, i.e. connected vascularly to the stem and not to adventitious roots arising from the stem (James et al. 1992). The histological organization of stem nodules is similar to that of aeschynomeneoid type of nodules according to Corby (1988), where an intercellular mode of entry takes place

at the base of lateral or adventitious roots (Goormachtig et al. 2004). These observations, combined with observations made on seedlings in the swamp forests of Guadeloupe (Bâ unpubl. data), suggest that stem nodules are formed and grow on *P. officinalis* seedlings only under flooding. Hence, we report here the novel occurrence of stem nodules in *P. officinalis* seedlings. Stem nodulation in legumes is a relatively rare structure that has been confirmed only in some nodulated hydrophytes such as *Aeschynomene*, *Sesbania*, *Discolobium* and *Vigna* growing on seasonally or permanently flooded wetlands in Africa and South America (Dreyfus and Dommergues 1981; Alazard 1985; Loureiro et al. 1995; James et al. 2001). In our study, nitrogenase activity of stem nodules was lower than that of corresponding root nodules on *P. officinalis* seedlings. Root nodules developed and fixed N₂ similarly under both flooding and non-flooding conditions. Therefore, flooding did not affect root nodule formation and N₂ fixation as shown on *Discolobium pulchellum* (Loureiro et al. 1994). Furthermore, there was also a significant increase in N within leaves of both flooded and non-flooded inoculated plants by *Bradyrhizobium*, resulting from an increase in the N₂-fixing of root nodules. Nevertheless, under flooded conditions, N acquisition did not enhance total dry weight of seedlings when compared with non-inoculated controls. One possible explanation for this, may be the nitrogenase activity that we detected in root nodules of controls. However, N₂ fixation appeared to be similar to that in swamp forests (Saur et al. 1998), but very low, compared to that of hydrophytes such as *Aeschynomene*, *Sesbania*, and *Discolobium* (Dreyfus and Dommergues 1981; Alazard 1985; Loureiro et al. 1994).

Surprisingly, AM colonization did not increase root nodulation in *Pterocarpus* seedlings under both flooding and non-flooding. We also found that plants double inoculated with *G. intraradices* and *Bradyrhizobium* displayed a reduction of root nodulation compared with plants single inoculated with *Bradyrhizobium* in non-flooded conditions. However, colonization of plants by *G. intraradices* did not increase ARA activity compared with plants single inoculated with *Bradyrhizobium*. These results suggest a competitive interaction between both endophytes. *G. intraradices* has been described as is an aggressive AM fungus in terms of intensity of root colonization, production of vesicles and spores, and requirement for photosynthetic products (Graham et al. 1996; Ruiz-Lozano et al. 2001). This could have lead to a competitive interaction between *G. intraradices* and *Bradyrhizobium*, which resulted in a less effective combination of endophytes for root nodulation in non-flooded conditions. In this respect, Ruiz-Lozano et al. (2001) described detrimental effects on root nodulation in soybean plants after dual inoculation with *G. intraradices* and *Bradyrhizobium*.

To conclude, this study showed that infectivity and activity of the nodulated and AM plants seem to be dependent on soil flooding. Furthermore, it provides supporting evidence that AM colonization by *G. intraradices* contributed substantially to the flooded tolerance of *P. officinalis* seedlings. This could be due to the increasing O₂ diffusion through the greater development of adventitious roots, aerenchymatous tissue and hypertrophied lenticels on the root zone and submerged part of the stem.

It is therefore possible that AM colonization and nodulation may contribute to the establishment of *P. officinalis* along a wider range of soil flooding levels in swamp forests. However, further experimental investigations should be done to understand the mechanisms by which AMF increases AM colonization of *P. officinalis* seedlings in flooding and its adaptive significance.

Acknowledgments

We thank the AUF (grant n° 04.234), the GIS ECOFOR and the Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable (grant n° 020000118) for their financial support. This work was supported by a doctoral grant from the Guadeloupe region to F. M. We thank Dr. Marc Chillet (CIRAD, Guadeloupe) for providing access to gas chromatography facilities, and Josely Lacroix for revising English on the manuscript.

References

- Alazard D (1985) Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. Appl Env Microbiol 50 : 732-734
- Alvarez-Lopez M (1990) Ecology of *Pterocarpus officinalis* forested wetlands in Puerto Rico. In : Lugo AE, Brinson M, Brown S (eds), Ecosystems in the world 15 forested wetlands. Elsevier, Amsterdam, pp 251-265
- Bâ AM, Samba R, Sylla SN, Le Roux C, Neyra M, Rousteau A, Imbert D, Toribio A (2004) Caractérisation de la diversité des microorganismes symbiotiques de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses de Guadeloupe et de Martinique. Rev Ecol 59: 163-170

- Barrios E, Herrera R (1993) Nitrogen cycling in a Venezuelan tropical seasonally flooded forest : soil nitrogen, mineralization and nitrification. *J Trop Ecol* 10: 399-416
- Barrett-Lennard EG (2003) The interaction between waterlogging and salinity in higher plants : causes, consequences and implications. *Plant Soil* 253: 35-54
- Bohrer EK, Friese CF, Amon JP (2004) Seasonal dynamic of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza* 14: 329-337
- Brown AM, Bledsoe C (1996) Spatial and temporal dynamics of mycorrhizas in *Jaumea carnosa*, a tidal saltmarsh halophyte. *J Ecol* 84: 703-715
- Brundrett MC, Piche Y, Peterson RL (1985) A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. *Can J Bot* 63: 184-194
- Carter JL, Colmer TD, Veneklaas EJ (2005) Variable tolerance of wetland tree species to combined salinity and waterlogging is related to regulation of ion uptake and production of organic solutes. *New Phytol* 169 : 123-134
- Carvalho LM, Correia PM, Caçador I, Martins-Louçao A (2003) Effects of salinity and flooding on the infectivity of salt marsh arbuscular mycorrhizal fungi in *Aster triplum* L. *Biol Fertil Soils* 38 : 137-143
- Carvalho LM, Correia PM, Martins-Louçao A (2004) Arbuscular mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh. *Mycorrhiza* 14: 165-170
- Corby HDL (1988) Types of rhizobial nodules and their distribution among the Leguminosae. *Kirria* 13 : 53-123
- Crawford RMM (1982) Physiological responses to flooding. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds), *Physiological plant ecology III, water relations and carbon assimilation*, Springer-Verlag, vol. 12B, pp 455-477
- Dommergues Y, Duhoux E, Diem HG (1999) Les arbres fixateurs d'azote. *Espaces* 34 (ed), p 499
- Diabaté M, Munive A, De Faria SM, Bâ AM, Dreyfus B, Galiana A (2004) Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African tropical rainforest and inoculation response of native species useful in reforestation. *New Phytol* 166: 231-239
- Dreyfus B, Dommergues Y (1981) Nitrogen-fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiol Letters* 10: 313-317
- Entry JA, Rygiewicz PT, Watrud LS, Donnelly PK (2002) Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. *Adv Environ Res* 7: 123-138
- Eusse AM, Aide TM (1999) Patterns of litter production across a salinity gradient in a *Pterocarpus officinalis* tropical wetland. *Plant Ecol* 145: 307-315

- Gagnon J, Haycock KA, Roth JM, Feldman DS, Finzer WF (1989) Abacus Concepts, SuperAnova : Les Modèles Linéaires Généralisés. Abacus concepts, Inc. Berkeley, CA, USA 69 : 173-180
- Gomes ARS, Kozlowski TT (1980) Growth responses and adaptations of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to flooding. Plant Physiol 66: 267-271
- Goormachtig S, Capoen W, Holsters M (2004) *Rhizobium* infection : lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. Trends Plant Sc 11 : 518-522
- Graham JH, Drouillard DL, Hodge NC (1996) Carbon economy of sour orange in response to different *Glomus* spp. Tree Physiology 16 : 1023-1029
- Hartmond U, Schaesberg NV, Graham JH, Syvertsen JP (1987) Salinity and flooding stress effects on mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus rootstock seedlings. Plant Soil 104: 37-43
- Hewitt EJ (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communications. N° 22, 2nd ed revised. Commonwealth Agricultural Bureau, London.
- Imbert D, Bonhême I, Saur E, Bouchon C (2000) Floristics and structure of the *Pterocarpus officinalis* swamp forest in Guadeloupe, Lesser Antilles. J Trop Ecol 16: 55-68
- James EK, Sprent JI, Sutherland JM, McInroy SG, Minchin FR (1992) The structure of nitrogen fixing root nodules on the aquatic mimosoid legume *Neptunia plena*. Ann Bot 69 : 173-180
- James EK, de Fatima Loureiro M, Pott VJ, Martins CM, Franco AA, Sprent JI (2001) Flooding-tolerant legume symbiosis from the Brazilian Pantanal. New Phytol 150: 723-738
- Koponen P, Nygren P, Domenach AM, Le Roux C, Saur E, Roggy JC (2003) Nodulation and dinitrogen fixation of legume trees in a tropical freshwater swamp forest in French Guiana. J Trop Ecol 19: 655-666
- Liao CT, Lin CH (2001) Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. Proc Natl Sci Counc 25: 148-157
- Loureiro MF, De Faria SM, James EK, Pott A, Franco AA (1994) Nitrogen-fixing stem nodules of the legume, *Discolobium pulchellum* Benth. New Phytol 128 : 283-295
- Loureiro MF, James EK, Sprent JI, Franco AA (1995) Stem and root nodules on the tropical wetland legume, *Aeschynomene fluminensis*. New Phytol 130: 531-544
- Moreira FMS, Freitas Da Silva M, De Faria SM (1992) Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. New Phytol 121: 563-570
- Miller SP, Sharitz RR (2000) Manipulation of flooding and arbuscular mycorrhiza formation influences growth and nutrition of two semi-aquatic grass species. Funct Ecol 14: 738-748
- Muller F, Vaillant A, Bâ AM, Bouvet JM (2006) Isolation and characterization of microsatellite

- markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq. Mol Ecol Notes 6: 462-464
- Muok BO, Ishii T (2006) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth and nutrient uptake of *Sclerocarya birrea* under water stress, salt stress and flooding. J Japan Soc Hort Sci 75: 26-31
- Neto D, Carvalho LM, Cruz C, Martin-Louçao MA (2006) How do mycorrhizas affect C and N relationships in flooded *Aster tripolium* plants ? Plant Soil 279 : 51-63
- Novozamsky VJG, Huba R, Van Vark W (1983) A novel digestion technique for multi-element plant analysis. Commun Soil Sci Plant Anal 14 : 239-249
- Osundina MA (1998) Nodulation and growth of mycorrhizal *Casuarina equisetifolia* J.R. and G. First in response to flooding. Biol Fertil Soils 26: 95-99
- Plenchette C, Declerck S, Diop T, Strullu DG (1996) Infectivity of monoaxenic subcultures of the AM fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-TDNA transformed root. Appl Microbiol Biotech 46: 545-548
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans Brit Mycol Soc 55: 158-161
- Roggy JC, Prévost MF, Garbaye J, Domenach AM (1999a) Nitrogen cycling in the tropical rainforest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using $\delta^{15}\text{N}$. J Trop Ecol 15: 1-22
- Roggy JC, Prévost MF, Gourbier F, Casabianca H, Garbaye J, Domenach AM (1999b) Leaf natural ^{15}N abundance and total N concentration as potential indicators of plant N nutrition in legumes and pioneer in a rainforest of French Guiana. Oecologia 120: 171-182
- Ruiz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, Azcon R (2001) Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. New Phytologist 151: 493-502
- Rutto KL, Mizutani F, Kadoya K (2002) Effect of root-zone flooding on mycorrhizal and non-mycorrhizal peach (*Prunus persica* Batsch) seedlings. Scientia Horticulturae 94: 285-295
- Saint-Etienne S, Paul S, Imbert D, Dulormne M, Muller F, Toribio A, Plenchette C, Bâ AM (2006) Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient. Forest Ecol Manag 232: 86-89
- Sanchez-Diaz M, Pardo M, Antolin M, Pena J, Aguirreolea J (1990) Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis. Plant Sci 71: 215-221
- Saur E, Bonhême I, Nygren P, Imbert D (1998) Nodulation of *Pterocarpus officinalis* in the swamp forest of Guadeloupe. J Trop Ecol 14: 761-770
- Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis, second edition. Academic Press, London, UK

- Stevens KJ, Spender SW, Peterson RL (2002) Phosphorus, arbuscular mycorrhizal fungi and performance of the wetland plant *Lythrum salicaria* L. under inundated conditions. Mycorrhiza 12: 277-283
- Vance CP (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiol 127: 390-397
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of root nodule bacteria, vol 15. Blackwell, Oxford, UK, Blackwell
- Walter CA, Bien A (1989) Aerial root nodules in the tropical legume, *Pentaclethra macroloba*. Oecologia 80: 27-31
- Wigand C, Stevenson JC (1997) Facilitation of phosphate assimilation by aquatic mycorrhizae of *Vallisneria americana* Michx. Hydrologia 342: 35-41

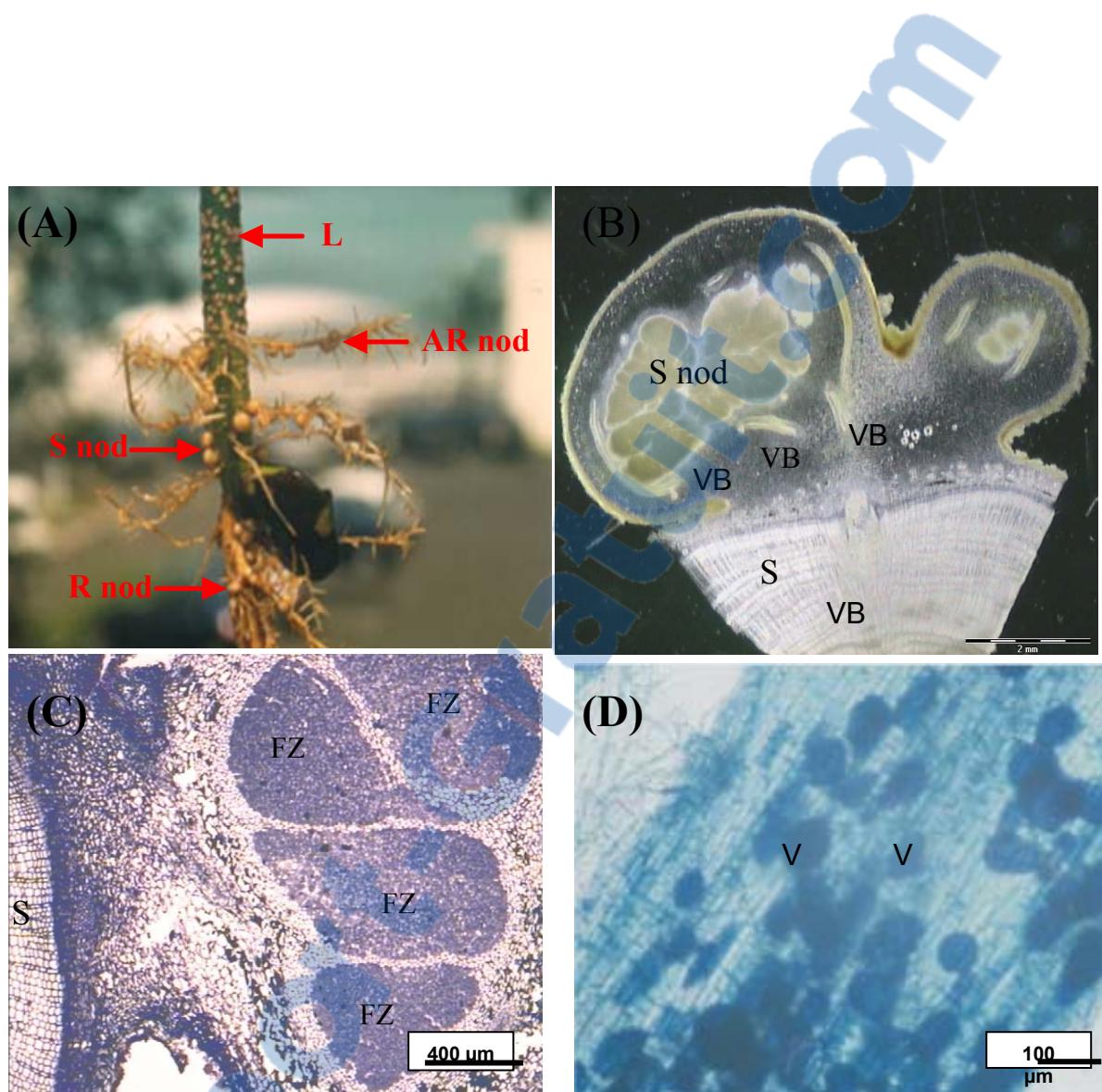


Figure 1. (A) : Partial view of the submerged part of stem in a *Pterocarpus officinalis* seedling. L, lenticels ; AR nod, adventitious root nodules ; S nod, stem nodules ; R nod, root nodules. (B) : Longitudinal sections through stem nodules of *P. officinalis*, showing the direct link of the peripheral nodular vascular bundles (VB) to the stem (S) vascularization. (C) : thin sections through nodular stem nodules illustrating cells are filled with densely packed bacteroids (FZ). (D) : Vesicles (V) within adventitious root.

Table 1. Significance levels for growth and nutritionnal parameters in *Pterocarpus officinalis* seedlings at two water levels, and inoculated or not with *Glomus intraradices* and *Bradyrhizobium* sp. alone or together. S, significant at p<5% ; NS, not significant.

Growth parameter	Flooding	Inoculation	Flooding x
			Inoculation
Height	S	NS	S
Collar diameter	S	S	S
Leaf dry weight	S	S	NS
Stem dry weight	S	S	S
Root dry weight	NS	S	NS
Number of adventitious roots	S	NS	NS
Adventitious root dry weight	S	NS	NS
Total dry weight	S	S	NS
Adventitious root colonization	S	NS	NS
Root colonization	S	S	S
Number of root nodules	NS	S	S
Root nodule dry weight	NS	S	NS
Number of stem nodules	S	S	S
Stem nodule dry weight	S	S	S
Nitrogen fixation in root nodules	NS	S	NS
Nitrogen fixation in stem nodules	S	S	S
N in leaves	NS	S	NS
P in leaves	NS	S	NS

Table 2. Effect of inoculation with *Glomus intraradices* (*Gi*) and *Bradyrhizobium* sp. (*Br*) on growth of *Pterocarpus officinalis* seedlings under flooded conditions (p<5%).

Treatments	Height (cm)	Collar diameter (mm)	Leaf (g)	Stem (g)	Root (g)	Number of adventitious roots	Adventitious roots (mg)	Total biomass (g)
Flooded								
Control	51.6 c	8.5 d	1.9 b	2.3 b	1.6 ab	4.1 b	20.1 b	5.8 bc
<i>Br</i>	48.3 bc	7.1 bc	1.8 b	3.5 cd	1.4 ab	4.1 b	19.2 b	6.7 cd
<i>Gi</i>	47.2 abc	8.3 d	1.9 b	3.2 c	1.9 b	4.6 b	21.3 b	7.1 d
<i>Br + Gi</i>	53.8 c	8.0 cd	2.2 b	3.8 d	1.6 ab	4.8 b	23.4 b	7.6 d
Non-flooded								
Control	40.6 a	6.1 b	1.0 a	1.5 a	1.1 a	0.0 a	0.0 a	3.6 a
<i>Br</i>	47.5 abc	4.6 a	1.3 a	1.8 ab	1.5 ab	0.0 a	0.0 a	4.7 b
<i>Gi</i>	51.5 c	4.9 a	1.7 b	2.1 b	1.8 ab	0.0 a	0.0 a	5.6 bc
<i>Br + Gi</i>	42.8 ab	6.6 b	1.3 a	2.1 ab	1.5 ab	0.0 a	0.0 a	4.8 b

Table 3. Effect of inoculation with *Glomus intraradices* (*Gi*) and *Bradyrhizobium* sp. (*Br*) on nodulation and mycorrhizal colonization of *Pterocarpus officinalis* seedlings under flooded conditions (p<5%)

Treatments	Number of root nodules	Root nodules (mg)	Number of stem nodules	Stem nodules (mg)	Adventitious root colonization (%)	Root colonization (%)
Flooded						
Control	5.3 a	22.0 a	2.3 b	0.4 a	0.0 a	0.0 a
<i>Br</i>	44.6 bc	131.0 c	12.1 c	7.0 c	0.0 a	0.0 a
<i>Gi</i>	3.3 a	41.0 ab	1.6 ab	0.4 a	56.2 b	66.1 d
<i>Br + Gi</i>	60.3 c	162.0 c	10.5 c	4.0 b	65.8 b	69.6 d
Non-flooded						
Control	1.3 a	8.0 a	0.0 a	0.0 a	-	0.0 a
<i>Br</i>	50.5 c	181.0 c	0.0 a	0.0 a	-	0.0 a
<i>Gi</i>	8.5 a	34.0 ab	0.0 a	0.0 a	-	28.6 b
<i>Br + Gi</i>	31.8 b	112.0 bc	0.0 a	0.0 a	-	44.7 c

Table 4. Effect of inoculation with *Glomus intraradices* (*Gi*) and *Bradyrhizobium* sp. (*Br*) on nitrogen fixation, N and P contents in leaves of *Pterocarpus officinalis* seedlings under flooded conditions (p<5%)

Treatments	Nitrogen-fixing		N leaves	
	P leaves			
	root nodules (µmol C ₂ H ₄ /h/g nodule dry weight)	stem nodules (µmol C ₂ H ₄ /h/g nodule dry weight)	(%)	(%)
Flooded				
Control	1.75 a	0.00 a	1.52 a	0.05 a
<i>Br</i>	9.03 b	3.73 b	2.10 b	0.06 ab
<i>Gi</i>	1.83 a	0.00 a	1.45 a	0.10 c
<i>Br + Gi</i>	8.40 b	4.21 b	2.16 b	0.11 c
Non-flooded				
Control	0.00 a	-	1.56 a	0.07 b
<i>Br</i>	8.30 b	-	2.21 b	0.06 ab
<i>Gi</i>	1.88 a	-	1.43 a	0.11 c
<i>Br + Gi</i>	6.97 b	-	2.23 b	0.13 c

Chapitre 6: Discussion générale et perspectives

Cette étude constitue un travail exploratoire sur la compréhension des déterminants de la diversité, et de la physiologie d'espèces vivant en symbiose sous contraintes édaphiques en milieu insulaire. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif général de mieux appréhender le rôle fonctionnel des symbioses sous contraintes édaphiques mais aussi de comprendre l'impact des forces évolutives sur la diversité génétique d'une espèce forestière jusque-là très peu étudiée le *Pterocarpus officinalis* Jacq, ainsi que sur les symbiotes qui lui sont associés en milieu insulaire. Les populations endémiques des milieux insulaires ont eu l'occasion de s'adapter, pour former des systèmes biologiques capables de se maintenir et d'évoluer, laissant apparaître globalement une diversité relativement importante en terme d'espèces, certainement de par l'influence des nombreuses forces évolutives exacerbées par l'insularité. Cette étude nous aura permis d'aborder plusieurs caractéristiques de l'évolution en milieu insulaire, confirmant notamment l'augmentation de la dérive au sein des petites îles ou l'importance du régime de reproduction ainsi que de la dispersion aussi bien chez *P.officinalis* que pour ses symbiotes bactériens.

Diversité, dispersion et risque d'extinction chez *P.officinalis*

L'étude de la diversité génétique chez *P.officinalis* réalisée sur neuf populations réparties sur cinq îles des petites Antilles et sur le continent, outre l'identification et la publication des premiers marqueurs neutres de type microsatellite nucléaire spécifique à cette espèce, nous a permis de caractériser à partir d'amorces microsatellites chloroplastiques universelles, des couples d'amorces favorables à l'observation de la diversité chloroplastique. Ces marqueurs moléculaires, nous ont donné la possibilité de vérifier certains attendus concernant la diversité génétique en milieu insulaire : une baisse de la diversité, une hausse de la consanguinité, résultant certainement de la petite taille des populations, du faible nombre de colonisateurs et du faible taux de migrations. Les populations de *P.officinalis* étudiées semblent s'organiser un peu comme une métapopulation dans laquelle la différenciation observée entre sous-populations indiquerait une faible migration, peut-être le reliquat d'une époque ayant vu *P.officinalis* se répandre à travers la caraïbe. Cependant, *P.officinalis* semble être relativement bien adapté à son environnement de prédilection que sont les forêts marécageuses, mais aussi le milieu insulaire. La

capacité de ses gousses à flotter et à maintenir leur capacité germinative en eau douce, mais aussi leur relative tolérance à l'eau de mer favorisent sans doute la propagation limitée des gènes entre les différentes populations de la Caraïbe. Les pressions d'origines anthropiques de plus en plus importantes, que se soit à travers de l'urbanisation, la pollution, ou encore l'agriculture ont une forte tendance à réduire la taille et le nombre de population de *P.officinalis* et ainsi limiter la probabilité de migration entre sous-population. Sans recolonisation, la métapopulation s'éteindra, isolant d'autant plus fortement les résidus de populations, laissant libre cours aux spéculations sur les probabilités de survie de cette espèce qui en plus de son appauvrissement génétique devra déjà faire face à la montée du niveau marin. Si ce n'est l'intérêt de ne pas ajouter des noms supplémentaires à l'impressionnante liste des espèces disparues ou vouées à disparaître, la préservation des forêts à *P.officinalis* pourrait s'inscrire dans l'intérêt des populations humaines insulaires. D'une part, en formant un rempart face à la fureur des éléments (cyclones, tsunamis), mais aussi en préservant par l'intermédiaire de leurs racines le milieu marin des sédiments issus de l'érosion. Ces sédiments participent à l'opacification du milieu marin, limitant ainsi les capacités photosynthétiques du phytoplancton, des barrières de corail et, par voie de fait, le renouvellement des ressources halieutiques.

Cependant, ce travail de thèse nous a donné une idée de la diversité génétique et des risques encourus par un nombre restreint de populations. Au-delà de l'intérêt scientifique, l'élargissement de cette étude à de nouvelles populations serait favorable à mise en place d'un programme de préservation de *P.officinalis*, tout en affinant la compréhension de la dynamique de ses populations à l'échelle de la Caraïbe. Ainsi, il serait bon d'étayer notre échantillonnage à l'aide de populations vivant sur les côtes nord de l'Amérique de Sud et d'Amérique Centrale. Je pense particulièrement aux populations vénézuéliennes, colombiennes, mais aussi au Costa Rica qui présente des populations vivant sur les côtes pacifiques et caraïbes. Les îles de Trinidad et Tabago ne semblent pas sans intérêt non plus, si on se réfère aux travaux de Rivera-Ocasio (2003). D'une part, ces îles appartenaient au continent sud-américain, dont elles restent peu éloignées et surtout elles présentent une diversité génétique apparemment importante. Ce dernier point leur a valu d'être considérées comme un lieu de convergence de la diversité génétique de *P.officinalis* en provenance de l'Amérique du Sud et en particulier du delta de l'Orénoque, mais

aussi comme un échangeur avant redistribution par les courants marins des gènes vers les populations des petites et grandes Antilles et vers celles situées le long des côtes sud-américaine et centre-américaine (Rivera-Ocasio et al. 2002).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de dispersion des graines, il serait peut-être intéressant de soumettre des graines échouées en bord de mer à une étude génétique basée sur l'ADN chloroplastique, et de comparer les profils obtenus à ceux de populations témoins reparties dans la Caraïbe.

A la recherche des origines géographiques de *P.officinalis*

Si on se base sur le pollen contenu dans les sédiments, la colonisation du nouveau continent par *P.officinalis*, serait relativement récente (Graham 1995). *P.officinalis*, une espèce strictement américaine, et *P.giletti* son homologue africain, ont longtemps été considérés comme une seule et même espèce. C'est pourquoi, Rivera-Ocasio (2002) proposait une colonisation du nouveau continent par graines *via* le courant du Benguela ralliant les côtes sud-ouest de l'Afrique, aux côtes nord-est du Brésil.

Ce scénario semble conforté par l'étude réalisée dans le cadre de cette thèse. Même si les populations géographiquement proches sont génétiquement proches, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'isolement génétique par la distance (tests de Mantel (Muller et al. soumis en 2006 à Conservation Genetics)). Qui plus est, notre population guyanaise, n'est pas isolée des populations insulaires, mais occupe une position centrale comprise entre les populations échantillonnées en Guadeloupe et celles de Porto Rico, que ce soit avec les marqueurs nucléaires ou chloroplastiques (neighbour-joining tree (Muller et al. soumis en 2006 à Conservation Genetics). Ce dernier point semble indiquer une origine de la diversité au niveau du continent sud-américain.

Afin de clarifier cette situation, il pourrait s'avérer intéressant d'échantillonner et d'étudier des populations de *P.officinalis* issues du Nord-est brésilien et éventuellement de les comparer à des populations de *P.giletti* présentes sur les côtes ouest-africaines à l'aide de marqueurs chloroplastiques. De même, il devrait être possible de retracer plus précisément la colonisation des Amériques par les *Pterocarpus* (*P. santalinoides*, *P. santalinoides*, et *P.officinalis*) à l'aide d'horloges

moléculaires, en les comparant à des espèces africaines comme *P.giletti* ou *P.santaloides* présentes sur les deux continents.

Caractérisation et biogéographie des bactéries associées à *P.officinalis*

Une des particularités de cette thèse était de s'intéresser à la caractérisation systématique, mais aussi à la diversité génétique des bactéries vivant en symbiose avec *P.officinalis*. Toutes les souches bactériennes retrouvées dans les nodosités de *P.officinalis* se sont avérées appartenir au genre *Bradyrhizobium*. Même si la domination des *Bradyrhizobium* peut s'expliquer par leur tolérance aux cycles de sécheresse et d'inondation, ainsi qu'aux conditions d'anoxie saisonnière retrouvées en forêts marécageuses tropicales humides (Koponen et al. 2003), une spécificité d'hôte de la part de *P.officinalis* n'est pas à exclure. En ce sens, il pourrait être intéressant de tester l'inoculation de *P.officinalis* par des rhizobiums connus pour leur large spectre hôte.

La biodiversité des bactéries associées à *P.officinalis* s'est révélée très faible sur la base des marqueurs ITS 16S-23S. Cette observation peut s'interpréter comme le résultat de fortes pressions de sélection, en milieux extrêmes ; en l'occurrence la faible diversité floristique des populations insulaires, mais aussi les contraintes édaphiques telles que la salinité et l'inondation retrouvées en milieux marécageux insulaires. Cependant, les fortes similitudes génétiques observées entre les populations bactériennes insulaires avec des bactéries initialement retrouvées en zone aride d'Afrique de l'Ouest sur la base des marqueurs ITS 16S-23S semblent tout à fait singulières et permettent de s'interroger sur la biogéographie bactérienne. Certains animaux comme les oiseaux migrateurs sont capables de se disperser sur des distances parfois très importantes. Les végétaux, tout comme les microorganismes ont réussi à coloniser toute la planète, et ce bien avant l'arrivée des hommes, en utilisant différents moyens à leur disposition, que ce soit des fluides, tels l'air, l'eau ou encore des vecteurs animaux.

En ce sens, les courants aériens semblent particulièrement propices à une dispersion rapide de microorganismes vers un grand nombre d'habitats (Isard & S.H 2001; Prospero et al. 2005). Les transports à longues distances seraient directement

liés aux courants atmosphériques et à leurs particularités physico-chimiques, ainsi qu'à la durée d'un tel voyage. Les microorganismes présents dans l'atmosphère semblent capables de se servir des composées atmosphériques organiques et inorganiques afin de subvenir à leurs besoins en nutriments (Ariya & Amyot 2004), mais aussi de les utiliser comme refuge face aux stress abiotiques (UV, dessiccation). L'une des études les plus importantes sur la diversité des microorganismes présents dans l'atmosphère a été réalisée dans le Nord de la France par Maron (2005). Cette étude montre une forte prédominance des protéobactéries qui représentent 60% des bactéries retrouvées (19% d' α , 21% de β , 12% de γ , 8% de δ). La plus grande part des bactéries est associée à l'environnement des sols et des plantes. Parmi les α -protéobactéries retrouvées par Maron, notons la présence de bactéries symbiotiques telles que *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, et autres *Bradyrhizobium* (Maron et al. 2005).

Le flux de poussière arraché au sol africain se retrouvant dans l'atmosphère est estimé à plus d'1 milliard de tonnes par an (Griffin et al. 2001; Moulin et al. 1997). Une partie de ces poussières traverseraient la Méditerranée, et entre 30 et 50% de ces poussières survoleraient l'Atlantique en direction des Amériques (Kellogg et al. 2004). Pour la Caraïbe, le pic de poussières transportées se situe pendant la période de juin à octobre, coïncidant avec la saison cyclonique dans l'Atlantique tropical.

Une des originalités du transport aérien de bioaérosol entre l'Afrique de l'Ouest, et la Caraïbe repose, d'une part, sur des microorganismes provenant de région aride, donc moins sujet aux problèmes de déshydratation, et, d'autre part, aux altitudes relativement faibles dans lesquelles se déplacent les nuages de poussière (à proximité de la couche d'air marine riche en eau). Ce phénomène pourrait expliquer la plus forte chance de survie des microorganismes de par la faible concentration en UV à laquelle ils sont soumis et, par la plus forte teneur en eau disponible à proximité de la couche atmosphérique d'origine marine (Prospero et al. 2005). Par l'intermédiaire des satellites tel que TOMS (Herman et al. 1997), il a pu être observé que les nuages de poussière se dispersant dans la caraïbe sont émis depuis l'Afrique par vagues successives (Figure 28) (Prospero et al. 2005), le voyage d'un tel nuage dure à peu près une semaine (Griffin et al. 2003; Prospero et al. 2005). De récentes

études, réalisées sur la composition en bioaérosols de l'atmosphère à la Barbade (Sud-Est de la Caraïbe), ont montré une nette corrélation entre la quantité de poussières originaires de l'Afrique de l'Ouest et la concentration de bactéries ainsi que de champignons cultivables retrouvés dans l'atmosphère (Prospero et al. 2005). De même, la présence de bactéries symbiotiques viables fortement similaires à des souches isolées préalablement en Afrique de l'Ouest, et en Asie a été mise en évidence par Griffin lors de collectes réalisées dans la Caraïbe (Griffin et al. 2003).

Si l'idée d'un transport transatlantique des microorganismes est relativement récente, un certain nombre d'exemples nous ont été offerts. C'est le cas de *Peronospora tabacina* Adam (pathogène du tabac), transporté périodiquement entre Cuba et le sud-est des Etats-Unis (Davis & Monahan 1991; Prospero et al. 2005). L'*urediospore* (rouille de la canne à sucre) qui a frappé la République Dominicaine, serait originaire du Cameroun, et aurait traversé l'Atlantique, potentiellement par les courants aériens (Prospero et al. 2005; Purdy et al. 1985). Une des dispersions transatlantique les plus évidente reste l'arrivée d'un essaim de sauterelles du désert Africain (*Schistocerca gregaria*) à la Barbade et à Trinidad en 1988 (Prospero et al. 2005; Ritchie et al. 1989). Il est intéressant de noter que les îles formant l'arc des petites Antilles, représente la première zone de relief après plus de 5000km de traversée transatlantique, favorisant ainsi les précipitations, et l'éventuel ensemencement par les microorganismes. Néanmoins, la présence de bactéries originaires de zones arides en zones marécageuses, salées de surcroît, peut paraître aberrante au premier abord. Cependant, ce serait faire abstraction de la similitude des mécanismes biologiques intervenant lors d'un stress hydrique, et à ceux mis en jeux dans la résistance face au stress osmotique initié par la salinité.



Figure 28. Image satellite présentant l'indice d'aérosol présent dans l'atmosphère

<http://toms.gsfc.nasa.gov/ep/toms/ep.html>

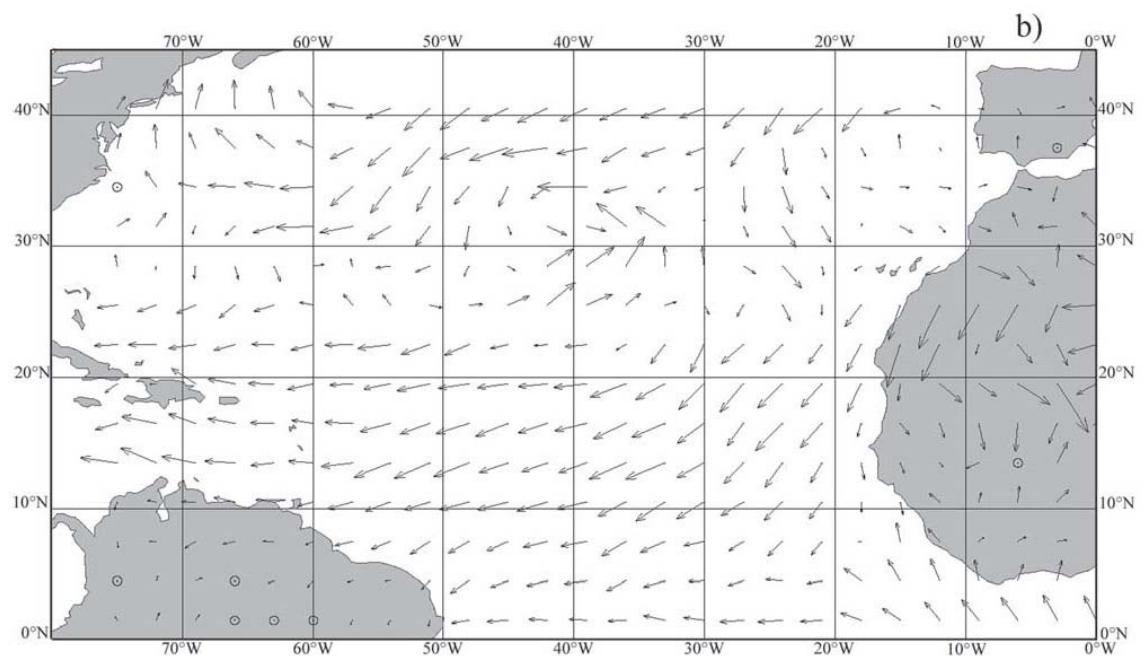


Figure 29. Carte des vents au-dessus de l'Atlantique le 14 juin 1994 (Météo France)

Source R.H Petit et al 2004

Écophysiologie des symbioses chez *Pterocarpus officinalis* en milieux salé et inondé

Comme la plupart des Légumineuses, *P. officinalis* est associé à des bactéries du genre *Bradyrhizobium* et à des champignons mycorhiziens à arbuscules (Bâ et al. 2004; Saint-Etienne et al. 2006). L'absence de spores dans les sols marécageux de la forêt de Belle Plaine (Guadeloupe) n'a pas permis l'identification taxonomique des champignons mycorhiziens à arbuscules inféodés à *P. officinalis*. La baisse du potentiel mycorhizien des sols marécageux, et donc du nombre de propagules viables, pourrait s'expliquer par l'augmentation de la salinité. En effet, on sait que les champignons mycorhiziens sont des microorganismes aérobies stricts, sensibles à la toxicité des ions Na^+ et Cl^- . En l'absence de spores, les champignons seraient présents dans le sol sous forme de mycélium libre et de fragments de racines mycorhizées. L'utilisation d'outils moléculaires pourrait permettre l'identification des champignons vivant en symbiose avec *P. officinalis*. Il semble que la mycorhization du *P. officinalis* soit moins affectée par la salinité que le potentiel mycorhizien des sols marécageux. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à l'état libre dans le sol, les propagules (hyphes, spores et fragments de racines mycorhizées) seraient directement exposées aux contraintes du milieu alors qu'en symbiose, elles bénéficiaient d'une niche écologique protectrice dans la plante hôte.

Dans notre étude, il apparaît que *P. officinalis* est bien adapté aux contraintes rencontrées en forêt marécageuse. Nous avons observé une amélioration de sa croissance en milieu inondé. Cette amélioration de la croissance s'est vue accompagnée de modifications physiologiques comparables à celles observées chez les plantes aquatiques, comme l'apparition de racines adventives, d'aérenchymes et de lenticelles (Fougnies et al. Soumis en août 2006 à Mycorrhiza). Chez les plants inoculés, l'inondation a induit aussi la formation de nodules caulinaires et de mycorhizes à arbuscules sur les racines adventives. Ce résultat est original, car c'est la première fois que des nodules de tiges et des mycorhizes à arbuscules de racines adventives sont observés chez une Légumineuse arborescente. Malgré l'activité fixatrice d'azote (ARA) dans les nodules et l'acquisition d'azote dans les feuilles, l'inoculation avec la souche *Bradyrhizobium* sp. n'a pas montré d'effet bénéfique sur la biomasse totale du *Pterocarpus*, notamment en milieu inondé. Par contre, la

souche *G. intraradices* s'est révélée efficace sur la biomasse totale des *P. officinalis* grâce à une colonisation racinaire tout à fait remarquable en milieu inondé. Cette colonisation racinaire par le champignon s'est aussi traduite par une augmentation du phosphore dans les feuilles. L'oxygénation des parties submergées de la tige au travers des lenticelles, des racines adventives et des aérenchymes, pourraient favoriser la colonisation remarquable du système racinaire de *Pterocarpus* par le champignon mycorhizien à arbuscules. La double inoculation n'a cependant pas permis de mettre en évidence une synergie d'action des deux symbiotes sur la croissance et la fixation d'azote des *Pterocarpus*. Une compétition entre les deux microorganismes pour les ressources carbonées provenant de la plante hôte n'est pas à exclure, compte tenu de la diminution du nombre de nodules en présence de mycorhizes notamment en milieu non inondé. Une étude cytologique pourrait nous apporter des informations sur le mode d'infection des deux microorganismes endophytes du *Pterocarpus*.

Nous avons étudié en serre l'adaptation des symbioses de *P. officinalis* à l'inondation ou à la salinité. Or, dans les forêts marécageuses, en particulier celles qui sont situées en arrière de la mangrove, *P. officinalis* est soumis à l'inondation et à la salinité une partie de l'année. Nous envisageons d'évaluer l'adaptation de *P. officinalis* et de ses symbiotes face aux deux contraintes (sel et inondation), afin de mieux appréhender le rôle des champignons mycorhiziens à arbuscules et des *Bradyrhizobium*.

L'inoculation croisée de plantules de *P. officinalis* et de souches bactériennes d'origines géographiques distinctes, pourrait nous apporter des informations quant à une spécificité d'hôte, par l'intermédiaire de données écophysiologiques (poids et nombre de nodule, efficacité de la fixation symbiotique, croissance, taux d'azote dans la plante, etc.). Toutefois, afin de tester l'hypothèse d'une coévolution des partenaires symbiotiques soumis à l'influence des forces évolutives, il pourrait se révéler profitable de caractériser la diversité génétique spécifique de la symbiose chez les différents acteurs. L'étude pourrait alors se baser, non plus sur des marqueurs génétiques neutres (microsatellites, ITS) comme nous l'avons fait, mais sur des gènes intervenants dans l'initiation et la mise en place de la symbiose (gène codant pour les flavonoïdes chez la plante, gène NodD chez les bactéries).

Les études d'écophysiologie des symbioses en forêts marécageuses, réalisées dans le cadre de cette thèse, ont toutes été menées soit sous conditions contrôlées en laboratoire, soit sous serres. Dans une optique de conservation, et de restauration des forêts marécageuses dégradées, voire menacées en Guadeloupe, ou de tous autres sites de son aire de répartition, des renseignements sur la croissance en conditions naturelles de *P. officinalis* associé à ses symbiotes, pourraient s'avérer particulièrement utiles.

Valorisation des travaux

Articles scientifiques

Muller F, Vaillant A, Bâ AM, Bouvet JM (2006 a). Isolation and characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq. Molecular Ecology Notes 6: 462- 464

Muller F, Voccia M, Bâ AM, Bouvet JM (2006 b). Pattern of genetic diversity and gene flow of a tree species distributed continental and insular Caribbean zones: case of *Pterocarpus officinalis* Jacq. Conservation Genetic (submitted)

Muller F, Béna G, Le Roux C, Prin Y, Bouvet JM, Bâ AM, Dreyfus B (2006 c) Genetic diversity patterns of *Bradyrhizobium* strains associated with *Pterocarpus officinalis* Jacq. in continental and insular Caribbean zones (en préparation)

Saint-Etienne S, Paul S, Imbert D, Dulormne M, Muller F, Toribio A, Plenchette C, Bâ AM (2006). Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient. Forest Ecology and Management 232 : 86-89.

Fougnies L, Renciot S, Muller F, Plenchette C, Prin Y, De Faria SM, Bouvet JM, Sylla SND, Dreyfus B, Bâ AM (2006). Arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings. Mycorrhiza (submitted)

E. Bandou, F. Lebailly, F. Muller, M. Dulormne, A. Toribio, J. Chabrol, R. Courtecuisse, C. Plenchette, Y. Prin, R. Duponnois, M. Thiao, S. Sylla, B. Dreyfus, A. M. Bâ (2006) The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. Mycorrhiza (Accepted: 3 August 2006

Participation à des colloques nationaux et internationaux

Muller F, Voccia M, Bouvet JM, Béna G, Vaillant A, Prin Y, Le Roux C, Dreyfus B, Bâ AM (2005). Diversité et structuration génétique chez *Pterocarpus officinalis* et ses symbiotes bactériens en milieux insulaires et sur le continent. Dans : Comptes rendus du Colloque international et pluridisciplinaire, Les écosystèmes forestiers des Caraïbes, de la connaissance fondamentale à la gestion durable. Martinique, 5-10 décembre, (sous presse)

Muller F, Bouvet JM, Béna G, Vaillant A, Prin Y, Le Roux C, Rousteau A, Dreyfus D, Bâ AM (2004). Diversité génétique et phylogéographie de la symbiose *Pterocarpus officinalis* (Jacq.)-*Bradyrhizobium* spp. dans la région caraïbe. Abstract presented at the 11th Congress of the African Association for the Biological Nitrogen Fixation meeting, 22-27 November, IRD/ISRA/UCAD,CIRAD, Dakar, Sénégal, p. 59.

Muller F, Bouvet JM, Béna G, Vaillant A, Prin Y, Le Roux C, Rousteau A, Dreyfus B, Bâ AM (2005). Molecular markers to assess genetic diversity and structure of *Pterocarpus officinalis* Jack and its associated micro-organisms in the marshy forests. Abstract presented at the Forest Tree Genome Workshop, Plant and Animal Genome XIII Conference, Town & Country Convention Center, San Diego, USA, p. 13.

Dulormne M, Muller F, Gatibelza A, Toribio A, Plenchette C, Bâ AM (2005). Morphologie, comportement hydrique et biomasse du *Pterocarpus officinalis* associée à une bactérie fixatrice d'azote (*Bradyrhizobium* spp.), en situation de salinité et d'inondation. Dans : Comptes rendus du Colloque international et pluridisciplinaire, Les écosystèmes forestiers des Caraïbes, de la connaissance fondamentale à la gestion durable. Martinique, 5-10 décembre, (sous presse)

Fougnies L, Renciot S, Muller F, Dulormne M, Prin Y, Le Roux C, Bouvet JM, Béna G, Dreyfus B, Toribio A, Plenchette C, Bâ AM (2004). Nodulation and growth of mycorhizal *Pterocarpus officinalis* (Jacq.) seedlings in response to flooding. Abstract presented at the 11th Congress of the African Association for the Biological Nitrogen Fixation meeting, 22-27 November, IRD/ISRA/UCAD/CIRAD, Dakar, Sénégal, p. 84.

Références

Rapport-Gratuit.Com

Abbott, L. K., and A. D. Robson. 1991. Field management of mycorrhizal fungi. . In. The rhizosphere and plant growth. D.L. Keister & P.B. Cregan Eds Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands p 355-362.

Aguilar, O. M., O. Riva, and E. Peltzer. 2004. Analysis of Rhizobium etli and of its symbiosis with wild Phaseolus vulgaris supports coevolution in centers of host diversification. PNAS **101**:13548–13553.

Al-Karaki, G. N. 2000. Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. Mycorrhiza **10**:51-54.

Al-karaki, G. N., and R. Hammad. 2001. Mycorrhizal influence on fruit yield and mineral content of tomato grown under salt stress. Journal of plant nutrition **24**:1311-1323.

Allen, E. B., and G. L. Cunningham. 1983. Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae on *Distichlis spicata* Under Three Salinity Levels. New Phytologist **93**:227-236.

Allen, O. N., and E. K. Allen. 1981. The leguminosae. A source book of charactérisatics use and nodulation. University of Wisconsin Press, Madisson.

Alvarez-Lopez, M. 1990. Ecology of *Pterocarpus officinalis* forested wetlands in Puerto Rico. . Lugo AE, Brinson M & Brown S (eds), Ecosystems in the world 15 forested wetlands. Elsevier, Amsterdam.:251-265.

Anderson, R. C., A. E. Liberta, and L. A. Dickman. 1984. Interaction of vascular plants and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi across a soil moisture-nutrient gradient. Oeologia **64**:111-117.

Andrianoelina, O., H. Rakotondraoelina, L. Ramamonjisoa, P. Danthu, and J.-M. Bouvet. 2005. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae), an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodiversity and Conservation* in press.

Ariya, P. A., and M. Amyot. 2004. New Directions: The role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmospheric Environment* **38**:1231-1232.

Bâ, A. M., R. Samba, S. Sylla, C. Le Roux, M. Neyra, A. Rouston, D. Imbert, and A. Toribio. 2002. Caractérisation de la diversité des microorganismes symbiotiques de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses de Guadeloupe et Martinique. Résumé des communications du colloque “ Importance de la Recherche dans les Aires Protégées : des fondements à la gestion ”, Société National de la Protection de la Nature, Guadeloupe, France:5.

Bâ, A. M., R. Samba, S. Sylla, C. Le Roux, M. Neyra, A. Rouston, D. Imbert, and A. Toribio. 2004. Caractérisation de la diversité des microorganismes symbiotiques de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses de Guadeloupe et Martinique. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)* **59**:163-170.

Bacon, P. 1990. Ecology and management swamp forest in the Guianas and Caribbean region. *Ecosystems of the World* 15. Forested Wetlands (eds Lugo AE, Brinson M, Brown S), pp. Elsevier, Amsterdam.:213-250.

Barrett-Lennard, E. G. 2003. The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant and Soil* **253**.

Barrett, S. C. H. 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* **351**:725-733.

Barrios, E., and R. Herrera. 1994. Nitrogen cycling in venezuelan tropical seasonally flooded forest: soil nitrogen mineralization and nitrification. *Journal of Tropical Ecology* **10**:399-416.

Berthomieu, P., G. Conéjero, A. Nublat, W. J. Brackenbury, C. Lambert, C. Savio, N. Uozumi, S. Oiki, K. Yamada, F. Cellier, F. Gosti, T. Simonneau, P. A. Essah, M. Tester, A.-A. Véry, H. Sentenac, and F. Casse. 2003. Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *Embo Journal* **22**:2004-2014.

Biermann, B., and R. G. Linderman. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* **95**:97-105.

Blondel, J. 1995. Biogéographie Approche écologique et évolutive. Masson, Paris, Collection Écologie.

Boncompagni, E., M. Østerås, M.-C. Poggi, and D. le Rudulier. 1999. Occurrence of Choline and Glycine Betaine Uptake and Metabolism in the Family Rhizobiaceae and Their Roles in Osmoprotection. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2072–2077.

Bonfante-Fasolo, P. 1984. Anatomy and morphology of VA Mycorrhizae. VA mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, Florida:pp. 5-33.

Bonhême, I., A. Rousteau, D. Imbert, and E. Saur. 1998. La Forêt marécageuse à *Pterocarpus officinalis*. Sa situation en Guadeloupe. *Bois et forêts des tropiques* **258**:59-66.

Boscari, A. 2004. Mécanisme de l'accumulation des bétaïnes en réponse au stress osmotique chez *Sinorhizobium melioti* en culture libre et lors de la symbiose avec *Medicago sativa*: importance du transporteur de bétaïnes, BetS. Thèse de doctorat présentée devant l'UNIVERSITE de Nice-Sophia Antipolis.

Bottin, L. 2006. Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire : cas de *Santalum austrocaledonicum* en

Nouvelle-Calédonie. Thèse de Biologie des Populations et Ecologie pour obtenir le grade de Docteur de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier

Bottin, L., D. Verhaegen, J. Tassin, A. Vaillant, and J.-M. Bouvet. 2005. Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular Ecology* **14**:1979-1989.

Broughton, W. J., and X. Perret. 1999. Genealogy of legume-Rhizobium symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* **2**:305-311.

Brown, S., and A. E. Lugo. 1990. Tropical secondary forests. *Journal of Tropical Ecology* **6**:1-32.

Brundrett, M. C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**:275–304.

Bryan, G. J., J. McNicoll, G. Ramsay, R. C. Meyer, and W. S. De Jong. 1999. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics and Applied Genetics* **99**:859-867.

Burns, R. C., and R. W. F. Hardy. 1975. Nitrogen Fixation in Bakteria and higher Plants. *Molekular Biologie, Biochemistry and Biophysics* 21, Springer Verlag Heidelberg-New York

Cadamuro, L. 1999. Structure et Dynamique des écosystèmes inondables (forêt marécageuse, mangrove) du bassin du Sinnamary (Guyane Française). These de UNIVERSITE PAUL SABATIER – TOULOUSE III en Ecologie Tropicale.

Chaintreuil, C., E. Giraud, Y. Prin, J. Lorquin, A. Ba, M. Gillis, P. de Lajudie, and B. Dreyfus. 2000. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:5437–5447.

Chen, W.-M., L. Moulin, C. Bontemps, P. Vandamme, G. Béna, and C. Boivin-Masson. 2003. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by B-Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of Bacteriology* **185**:7266–7272.

Chen, W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay, and P. Vandamme. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **51**:1729-1735.

Cintrón, B. B. 1983. Coastal freshwater swamp forests: Puerto Rico's most endangered ecosystem. A. E. Lugo Los bosques de Puerto Rico. Institute of Tropical Forestry, USDA 31,Forest Service, Rio Piedras P.R: 249-282.

Clobert, J. 1999. The evolutionary ecology of dispersal. *Tree* **14**.

Conde, M. F., D. R. Pring, and C. S. Levings. 1979. Maternal inheritance of organelle dans in *Zea mays-Zea perennis* reciprocal crosses. *Journal of Heredity* **70**:2-4.

Crawford, R. M. M. 1982. The anaerobic retreat as a survival strategy for aerobic plants and animals. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh* **44**: 44.

Davet, P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris:383p.

Davis, J. M., and J. F. Monahan. 1991. Climatology of air parcel trajectories related to the atmospheric transport of *Peronospora tabacina*. *Plant Disease* **75**:706-711.

de Bary, A. 1879. Die Erscheinung der Symbios.

de Faria, S. M., G. P. Lewis, J. I. Sprent, and J. M. Sutherland. 1989. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist* **111**:607–619.

Deiller, A. F., J. M. N. Walter, and M. Trémolières. 2003. Regeneration strategies in a temperate hardwood floodplain forest of the Upper Rhine: sexual versus vegetative reproduction of woody species. *Forest Ecology and Management* **180**:215-222.

Denarie, J., and J. Cullimore. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *cell* **74**:951-954.

Denison, F., and T. Kiers. 2004. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic? *Microbes and Infection* **6**:1235-1239.

Dexheimer, J., C. Marx, V. Gianinazzi-Pearson, and S. Gianinazzi. 1985. Ultracytological studies of plasmalemma formation produced by host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizae *Cytologia* **50**:461-471.

Dommergues, Y., E. Duhoux, and H. G. Diem. 1999. Les arbres fixateurs d'azote. in Dommergues Y., (Ed.), *Espaces* **34** p.**499**.

Douds, D. D., and P. E. Pfeffer. 2000. Carbon partitioning, cost, and metabolism of arbuscular mycorrhizas. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*.:pp. 107-129.

Dreyfus, B., J. L. Garcia, and M. Gillis. 1988. Characterization of Azorhizobium caulinodans gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from Sesbania rostrata. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**:89-98.

El-Mokadem, M. T., F. A. Helemish, S. M. Abdel-Wahab, and M. M. Abou-El-Nour. 1991. Salt response of clover and alfalfa inoculated with salt tolerant strains of Rhizobium. *Ain Shams Sciences*:441–468.

El-Sheikh, E. A. E., and M. Wood. 1990. Salt effects on survival and multiplication of chick pea and soybean rhizobia. *Soil biology & biochemistry* **22**:343–347.

Emerson, B. C. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular Ecology* **11**:951–966.

Ennos, R. A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* **72**:250-259.

Estoup, A., P. Jarne, and J.-M. Cornuet. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis *Molecular Ecology* **11**:1591-1604.

Eusse, A. M., and T. M. Aide. 1999. Patterns of litter production across a salinity gradient in a *Pterocarpus officinalis* tropical wetland. *Plant Ecology* **145**:307-315.

Fani, R., R. Gallo, and P. Lio. 2000. Molecular evolution of nitrogen fixation: the evolutionary history of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* genes. *Journal of molecular evolution*. **51**:1-11.

Fernandez-Pascual, M., C. De Lorenzo, M. De Felipe, S. Rajalakshmi, A. Gordon, B. Thomas, and F. Minchin. 1996. Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolopa. *Journal of Experimental Botany* **47**:1709–1716.

Fontaine, C., P. N. Lovett, H. Sanou, J. Maley, and J.-M. Bouvet. 2004. Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*:639-648.

Fougere, F., D. Le Rudulier, and J. G. Streeter. 1991. Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* **96**:1228-1236.

Fougnies, L., S. Renciot, F. Muller, C. Plenquette, Y. Prin, S. M. de Faria, J. M. Bouvet, S. N. Sylla, B. Dreyfus, and A. M. Bâ. Soumis en août 2006 à Mycorrhiza.

Nodulation and arbuscular mycorrhizal colonization improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings

Frank, B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhenden Ernährung gewisse Baume durch uterirdische Pilze. Berichte des Detsche Botanische Gesellschaft **3**:128-145.

Frank, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. . Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft **7**:332-346.

Frankel, O. H. 1983. The management in conservation. In Genetics and Conservation: a reference for Managing Wild Animals and Plant Populations. (ed. C.M. Schonewald-Cox, SM Chambers, B MacBryde and L Thomas), pp. 1-14. Benjamin / Cummings, Menlo Park, CA, USA.

Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. Conservation Biology **10**:1500-1508.

Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: island populations. Conservation Biology **15**:665-675.

Frankham, R., D. A. Briscoe, and J. D. Ballou. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, New York, New York, USA.

Gallego, V., M. T. Garcia, and A. Ventosa. 2006. *Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water. . International journal of systematic and evolutionary microbiology **56**:339-342.

Gamache, I., J. P. Jaramillo-Correa, S. Pyette, and J. Bousquet. 2003. Diverging pattern of mitochondrial and nuclear DNA diversity in subartic black spruce: imprint of a founder effect associated with postglacial colonization. Molecular Ecology **12**:891-901.

Gupta, P., D. William, E. Beavis, C. Brummer, C. Randy, H. Shoemaker, S. Thomas, F. Norman, Weeden, and N. D. Young. 2005. Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* **137**:1228-1235.

Gerdemann, J. 1971. Fungi that form the vesicular-arbuscular type of endomycorrhiza. In: Hacskaylo E (ed), *Mycorrhizae Proceedings of the first north American conference on mycorrhizae*.

USDA Misc Publ 1189, pp 9–18

Gianinazzi, S., V. Gianinazzi-Pearson, and J. Dexheimer. 1979. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localisation of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. Gerd.) *The New Phytologist* **82**:127-132.

Glenz, C., R. Schlaepfer, I. Iorgulescu, and F. Kienast. 2006. Flooding tolerance of central european tree and shrub species. *Forest Ecology and Management* (in press)

Gomez, A. G.-M., SC, C. Collada, J. Climent, and L. Gill. 2003. Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* **107**:1123-1131.

Goormachtig, S., W. Capoen, and M. Holsters. 2004. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends in Plant Science* **9**:518-522.

Graham, A. 1995. Diversification of Gulf/Caribbean mangrove communities through Cenozoic time. *Biotropica* **27**:20-27.

Graham, J. H. 2000. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. *Current advances in mycorrhizae research*:pp. 127-140.

- Graham, P. 1992. Stress tolerance in rhizobium and bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions. *canadian Journal of Microbiology* **38**:475-484.
- Griffin, D. W., V. H. Garrison, J. R. Herman, and E. A. Shinn. 2001. African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health. *Aerobiologia* **17**:203-213.
- Griffin, D. W., C. A. Kellogg, V. H. Garrison, J. T. Lisle, T. Borden, C, and E. A. Shinn. 2003. Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust events. *Aerobiologia* **19**:143-157.
- Gürtler, V., and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**:3–36.
- Hamrick, J. L., and J. D. Nason. 2000. Gene Flow in Forest Trees, *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. (ed A. Young, D. Boshier, and T. Boyle), pp. 1-3. New York, USA.
- Hardy, G. H. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* **28**:49-50.
- Herman, J. R., P. K. Bhartia, O. Torres, C. Hsu, C. Seftor, and E. Celarier. 1997. Global distribution of UV-absorbing aerosols from Nimbus 7/TOMS data. *Journal of geophysical research* **102**:16911–16922.
- Hirrel, M. C., and J. W. Gerdemann. 1980. Improved growth of onion and dell pepper in saline soils by two vesicular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of America journal* **44**:654-655.
- Hirsch, A. M., M. R. Lum, and J. A. Downie. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so spécial? *Plant Physiology* **127**:1484-1492.

Imbert, D., F. Bland, and F. Russier. 1988. Les milieux humides du littoral guadeloupéen. Office national des forêts:40-49.

Imbert, D., I. Bonhême, E. Saur, and C. Bouchon. 2000. Floristics and structure of *Pterocarpus officinalis* swamp forest in Guadeloupe, Lesser Antilles. Journal of Tropical Ecology **16**:55-68.

Imbert, D., and G. Leblond. 2001. Diagnostic écologique de la forêt marécageuse de Galion. Approche structurale et fonctionnelle des biocénoses animales et végétales. PNRM, UAG-BIOS.

Isard, S. A., and G. S.H. 2001. Flow of Life in the Atmosphere: An Airscape Approach to Understanding Invasive Organisms. Michigan State University Press:304 pp.

Jabaji-Hare, S., A. Deschêne, and B. Kendrick. 1984. Lipid content and composition of vesicles of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. . Mycologia **76**:1024-1030.

Jarne, P., and P. Lagoda. 1996. Microsatellites from molecules to populations and back. Trends in
Ecology and Evolution **11**:424-429.

Jarvis, B. D. W., P. Van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernandez, J. C. Cleyet-Marel, and M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology **47**:895-898.

Jordan, D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic Bacteriology **32**:136-139.

- Kellogg, C. A., D. W. Griffin, V. H. Garrison, K. K. Peak, N. Royall, R. R. Smith, and E. A. Shinn. 2004. Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa. *Aerobiologia* **20**:99–110.
- Khan, A. G. 1993. Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New South Wales, Australia. *Mycorrhiza* **3**:31-38.
- King, R. A., and C. Ferris. 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology* **7**:1151-1161.
- Kistner, C., and M. Parniske. 2002. Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science* **7**:511-518.
- Koponen, P., P. Nygren, A. M. Domenach, C. Le Roux, E. Saur, and J. C. Roggy. 2003. Nodulation and dinitrogen fixation of legume trees in tropical freshwater swamp forest in French Guiana. *Journal of Tropical Ecology* **19**:655-666.
- Krasova-Wade, T., I. Ndoye, S. Braconnier, B. Sarr, P. de Lajudie, and M. Neyra. 2003. Diversity of indigenous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). *African Journal of Biotechnology* **2**:13–22.
- Lavin, M., B. P. Schrire, G. Lewis, R. T. Pennington, A. D. Salinas, M. Thulin, C. E. Hughes, A. B. Matosk, and M. F. Wojciechowski. 2004. Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes. *The Royal Society* **359**:1509–1522.
- Lavin, M., M. F. Wojciechowski, A. Richman, J. Rotella, M. J. Sanderson, and A. B. Matosk. 2001. Identifying tertiary radiations of fabaceae in the greater Antilles: Alternatives to cladistic vicariance analysis. *International journal of plant sciences*:S53-S76.

Le Rudulier, D., A. R. Strøm, A. M. Dandekar, L. T. Smith, and R. C. Valentine. 1984. Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**:1064–1068.

Le Tacon, F., F. A. Skinner, and B. Mosse. 1986. Spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Gerdemann and Trappe) under decreased oxygen and increased carbon dioxide concentrations. *Canadian Journal of Botany* **29**:1280–1285.

Leblond-Bourget, N., H. Philippe, I. Mangin, and B. Decaris. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence Analyses Reveal Inter- and Intraspecific *Bifidobacterium* Phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology*:102-111.

Levins, R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of entomological society of America* **15**:237-240.

Lewis, G., B. Schrire, B. Mackinder, and L. M. 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Garden, Kew, UK.

Little, E. L., and F. H. Wadsworth. 1964. Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Agric. Handb. 205. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture.:548 p.

Lopez, O. R. 2001. Seed flotation and post-flooding germination in tropical terra firma and seasonally flooded forest species. *Functional Ecology* **15**:763-771.

Malloch, D. W., A. K. Pirozynski, and P. H. Raven. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**:2113-2118.

Maron, P.-A., D. P. H. Lejon, E. Carvalho, K. Bizet, P. Lemanceau, L. Ranjard, and C. Mougel. 2005. Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial

communities by DNA fingerprinting and 16S rDNA clone library. *Atmospheric Environment* **39**:3687-3695.

Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge, MA.

McKey, D. 1994. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of nitrogen-demanding lifestyle. Pp 211-229 in Sprent, J.L & McKey, D. (eds). *Advances in legume systematics 5: the nitrogen factor*. Royal Botanic Gradens, Kew.

Miller, S. P., and J. D. Bever. 1999. Distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in stands of the wetland grass *Panicum hemitomon* along a wide hydrologic gradient *Oecologia* **119**:586-592.

Moreira, F. M. S., M. Freitas Da Silva, and S. M. De Faria. 1992. Occurrence of nodulation in legume species in Amazon region of Brazil. *New Phytologist* **121**:563-570.

Moreira, F. M. S., K. Haukka, and J. P. W. Young. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brasil. *Molecular Ecology* **7**:889-895.

Morley, R. J. 2003. Interplate dispersal paths for megathermal angiosperms. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **6**:5-20.

Morton, J., S. Bentivenga, and J. Bever. 1995. Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Canadian Journal of Botany* **73**:S25-S32.

Moulin, C., C. E. Lambert, F. Dulac, and U. Dayan. 1997. Control of atmospheric export of dust from North Africa by the North Atlantic Oscillation. *Nature* **387**:691–694.

Moulin, L. 2002. Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia: de l'analyse du gène nodA à l'identification de rhizobia au sein des bêta-Proteobactéries. Thèse de doctorat présentée devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON1.

Moulin, L., G. Béna, C. Boivin-Masson, and T. Stezpkowskic. 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**:720–732.

Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the Beta-subclass of Proteobacteria *Nature* **411**:948–950.

Mousain, D. 1989. Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat d'Etat, USTL Montpellier II:279p.

Muller, F., A. Vaillant, A. M. Bâ, and J.-M. Bouvet. 2006. Isolation and Characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq. *molecular Ecology Notes* **6** 462–464.

Muller, F., M. Voccia, A. M. Bâ, and J.-M. Bouvet. soumis en 2006 à Conservation Genetics Pattern of genetic diversity of *Pterocarpus officinalis* Jacq., a tree species distributed in Caribbean zones: implications for its conservation in islands.

Müller, J., T. Boller, and A. Wiemken. 2001a. Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *Journal of Experimental Botany* **52**:943-947.

Müller, J., A. Wiemken, and T. Boller. 2001b. Redifferentiation of bacteria isolated from *Lotus japonicus* root nodules colonized by *Rhizobium* sp. NRG234. *Journal of Experimental Botany* **52**:2181-2186.

- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**:645.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**:853-858.
- Nash, D., and H. Schulman. 1976. The absence of oxidized leghemoglobin in soybean root nodules during nodule development. *Biochemical and biophysical research communications* **68**:781-785.
- Navascués, M., and B. C. Emerson. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Molecular Ecology* **14**:1333-1341.
- Neale, D. B., and R. R. Sederoff. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics* **77**:212-216.
- Olmstead, R. G., and J. D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* **81**:1205-1224.
- Ovtsyna, A. O., R. Geurts, T. Bisseling, B. J. J. Lugtenberg, I. A. Tikhonovich, and H. P. Spalink. 1998. Restriction of Host Range by the sym2 Allele of Afghan Pea Is Nonspecific for the Type of Modification at the Reducing Terminus of Nodulation Signals. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**:418-422.
- Parker, M. A. 2003. Genetic markers for analysing symbiotic relationships and lateral gene transfer in Neotropical bradyrhizobia. *Molecular Ecology* **12**:2447.
- Parker, M. A., J. L. Doyle, and J. J. Doyle. 2004. Comparative phylogeography of Amphicarpaea legumes and their root-nodule symbionts in Japan and North America. *Journal of Biogeography* **31**:425–434.

Parrish, T. L. 2002. Krakatau: genetic consequences of island colonization. <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2003-0307-101001/inhoud.htm>.

Patriarca, E. J., R. Tatè, and M. Iaccarino. 2002. Key Role of Bacterial NH₄⁺ Metabolism in Rhizobium-Plant Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**:203-222.

Peltier, W. R., and R. G. Fairbanks. 2006. Global glacial ice volume and Last Glacial Maximum duration from an extended Barbados sea level record. *Quaternary Science Reviews*.

Pennington, R. T., and W. D. Christopher. 2004. The role of immigrants in the assembly of the South American rainforest tree flora. *The Royal Society*.

Pennington, T. D., and J. Sarukhan. 1968. Manual para la identificación de los principales árboles tropicales de México. Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales.:413 p.

Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton. 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:180-201.

Petit, R. J., J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvini, and G. G. Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* **14**:689-701.

Pfeiffer, C. M., and H. E. Bloss. 1988. Growth and nutrition of guayule (*Parthenium marginatum*) in a saline soil as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization. *New Phytologist* **108**:315-321.

Pindall, J. L., S. C. Cande, W. C. Pitman, D. B. Rowley, J. F. Dewey, J. La Brecque, and W. Haxby. 1988. A plate-kinematic framework for models of Caribbean evolution. *Tectonophysics* **155**:121–138.

Prospero, J. M., E. Blades, G. Mathison, and R. Naidu. 2005. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia* **21**:1-19.

Provan, J., W. Powell, and P. M. Hollingsworth. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution* **16**:142-147.

Provorov, N. A. 1998. Review Article. Coevolution of rhizobia with legumes: Facts and hypotheses. *Symbiosis* **24**:337-368.

Pueppke, S., and W. Broughton. 1999. Rhizobium sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular plant-microbe interactions* **12**:293-318.

Purdy, L. H., S. V. Krupa, and J. L. Dean. 1985. Introduction of sugarcane rust into the Americas and its spread to Florida.
. *Plant Disease* **69**:689–693.

Ritchie, M., D. Pedgley, Desert Locusts cross the, and Atlantic. *Antenna* **13**. 1989. Desert Locusts cross the Atlantic. *Antenna* **13**:10-12.

Rivas, R., E. Velazquez, A. Willems, N. Vizcaíno, N. S. Subba-Rao, P. F. Mateos, M. Gillis, F. B. Dazzo, and E. Martínez-Molina. 2002. A New Species of *Devosia* That Forms a Unique Nitrogen-Fixing Root-Nodule Symbiosis with the Aquatic Legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:5217–5222.

Rivera-Ocasio, E., T. M. Aide, and W. McMillan. 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Molecular Ecology* **11**:675-683.

Roggy, J. C., and M. F. Prevost. 1999. Nitrogen-fixing legumes and silvigenesis in rain forest in French Guiana: a taxonomic and ecological approach. *New Phytologist* **144**:283-294.

Rojo, J. P. 1972. *Pterocarpus* (Leguminosae-Papilionaceae) revised for the world. *Phanerogamarum Monographiae Tomus V.* Lehre, Germany Verlag von J. Cramer.:119 p.

Rose, M. D., and G. A. Polis. 2000. On the insularity of islands. *Ecography* **23**:693-701.

Sabatier, D., and M. F. Prevost. 1994. Quelques données sur la composition floristique et la diversité des peuplements forestiers de Guyane Francaise. *Bois et forêts des tropiques* **219**:31-55.

Saint-Etienne, L., PAUL, N. Tromas, D. Imbert, M. Dulormne, F. Muller, A. Rousteau, A. Toribio, C. Plenquette, and A. M. Bâ. 2006. Arbuscular mycorrhizal soil infectivity along a salinity gradient in a *Pterocarpus* swamp forest Forest. *Forest Ecology and Management* **232**:86-89.

Saur, E., I. Bonhême, P. Nygren, and D. Imbert. 1998. Nodulation of *pterocarpus officinalis* in the swamp forest of Guadeloupe (lesser Antilles). *Journal of Tropical Ecology* **14**:761-770.

Savolainen, O., and H. Kuittinen. 2000. Small Populations Processes, Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. (ed. A. Young, D. Boshier, and T. Boyle), pp. 91-100. United Nations Development Program, New York, USA.

Schnell. 1967. Flore et végétation de l'Amérique tropicale. Masson, Paris, Collection Écologie.

- Schüssler, A., D. Schwartzzott, and C. Walker. 2001. A new phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**:1413-1421.
- Schwartz, D. C., and C. R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**:67-75.
- Selosse, M. A. 2000. La symbiose: structures et fonctions, rôle écologique et évolutif. Vuibert.
- Simon, L., J. Bousquet, R. C. Lévesque, and M. Lablonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**:67-69.
- Smith, S., and J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Clarendon Press, Oxford **2nd edn.**
- Sneath, P. H. A., and R. R. Sokal. 1973. San Francisco, Numerical taxonomy. Freeman,.573 p.
- Sprent, J. I. 1999. Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **2**:149-162.
- Sprent, J. I. 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew:p. 146.
- Stevens, K. J., and L. R. Peterson. 1996. The effect of a water gradient on the vesicular-arbuscular mycorrhizal status of *Lythrum salicaria* L. (purple loosestrife). *Mycorrhiza* **6**:99-104.
- Stevens, P. F. 2001. Angiosperm Phylogeny Website. Version 7, May 2006 [and more or less continuously updated since].

Swaraj, K., and N. Bishnoi. 1999. Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. Indian journal of experimental biology **37**:843-848.

Sy, A., E. Giraud, P. Jourand, N. Garcia, A. Willems, P. de Lajudie, Y. Prin, M. Neyra, M. Gillis, C. Boivin-Masson, and B. Dreyfus. 2001. Methylotrophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. Journal of Bacteriology **183**:214-220.

Tan, Z., T. Hurek, P. Vinuesa, P. Muller, J. K. Ladha, and B. Reinhold-Hurek. 2001. Specific detection of Bradyrhizobium and Rhizobium strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S–23S ribosomal DNA intergenic spacer- targeted PCR. Applied and Environmental Microbiology **67**:3655–3664.

Tarayre, M., P. , J. Saumitou-Laprade, D. Cuguen, and J. Couvet Thompson. 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.

Taylor, D. L., and J. M. Osborn. 1995. The importance of fungi in shaping the paléoecosystem. Review of Paleobotany and Palynology **90**:249-262.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic acids research **24**:4876-4882.

Tournaire-Roux, C., M. Sutka, H. Javot, E. Gout, P. Gerbeau, D.-T. Luu, R. Bligny, and C. Maurel. 2003. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. Nature **425**:393-397.

Trochain, J.-L. 1980. Ecologie végétale de la zone intertropicale non désertique. Toulouse: Paul Sabatier:468 pp.

Trujillo, M. E., A. Willems, A. Abril, A.-M. Planchuelo, R. Rivas, D. Ludena, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, and E. Velazquez. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1318–1327.

Tu, J. C. 1981. Effect of salinity on Rhizobium-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Canadian journal of plant science* **61**:231-239.

Valverde, A., E. Velázquez, F. Fernández-Santos, N. Vizcaíno, R. Rivas, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, J. M. Igual, and A. Willems. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**:1985-1989

Van Benden, P.-J. 1975. Les commensaux et les parasites. Paris.

Vandamme, P., J. Goris, W. M. Chen, P. de Vos, and A. Willems. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and applied microbiology* **25**:507–512.

Vandamme, P., B. Pot, G. M., P. de Vos, K. Kersters, and J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* **60**:407-438.

Varshney, R. K., A. Graner, and M. E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology* **23**:48-55.

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.

Vinuesa, P., C. Silva, D. Werner, and E. Martinez-Romero. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration

and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. Molecular phylogenetics and evolution **34**:29-54.

Weaver, P. L. 1997. *Pterocarpus officinalis* Jacq. Bloodwood. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.:7p.

Weising, K., and R. C. Gardner. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome **42**:9-19.

Willems, A., A. Munive, P. de Lajudie, and M. Gillis. 2003. In Most *Bradyrhizobium* Groups Sequence Comparison of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer Regions Corroborates DNA-DNA Hybridizations. Systematic and applied microbiology **26**:203-210.

Young, A. G., D. H. Boshier, T. J. Boyle, and (2000) (). 2000. Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. . ed. A. Young, D. Boshier, and T. Boyle, United Nations Development Program, New York, USA:pp. 1-3.

Young, J. M. 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "Sinorhizobium adhaerens" (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. International journal of systematic and evolutionary microbiology **53**:2107-2110.

Young, J. P. W., and A. W. B. Johnson. 1989. The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. Trends in ecology & evolution **4**:331-349.

Zahran, H. 1999. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. Microbiology and Molecular Biology **63**:968–989.

Zahran, H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology* **91**:143-153.

Zahran, H. H., and J. I. Sprent. 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* **167**:303–309.

ZAK, D., W. HOLMES, D. WHITE, A. D. PEACOCK, and D. TILMAN. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any link? *Ecology* **84**:2042-2050.

Zhu, J.-K. 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology* **4**:401-406.