



HAL
open science

Etude des variations moléculaires chez l'épicéa commun (*Picea abies* (L.) Karst.) à l'aide de marqueurs RAPD

Anne-Marie Collignon-Trontin

► To cite this version:

Anne-Marie Collignon-Trontin. Etude des variations moléculaires chez l'épicéa commun (*Picea abies* (L.) Karst.) à l'aide de marqueurs RAPD. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2000. Français. NNT : 2000NAN10125 . tel-01747411

HAL Id: tel-01747411

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747411>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

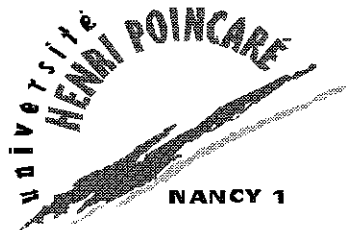
LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

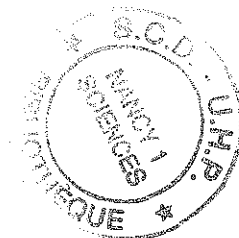
<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



52403

SC N2000 125/B

U.F.R. Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale
"Ressources, Procédés, Produits, Environnement"



Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, NANCY-I
en Biologie Forestière

par

Anne-Marie COLLIGNON-TRONTIN

**Etude des variations moléculaires chez l'Epicéa commun (*Picea abies* (L.) Karst.)
à l'aide de marqueurs RAPD**

Soutenue le 13 novembre 2000

Membres du Jury :

Rapporteurs :	M. François FELBER	Privat Doцент, Université de Neuchâtel (Suisse)
	M. Aboubakry SARR	Professeur, Université Paris VI
Examineurs :	M. Jacques-Louis de BEAULIEU	Directeur de recherche, CNRS, Marseille
	M. Bernard HEOIS	Ingénieur du GREF, CEMAGREF, Nogent-sur-Vernisson
	M. Jean-Michel FAVRE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
	M. Hervé VAN de SYPE	Chargé de recherche, I.N.R.A.-Orléans

*"Et rien, afin que tout dure, ne dure éternellement."
(Malherbe)*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Jean-Michel Faure, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et a assuré la direction de ma thèse. Je lui suis reconnaissante pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail et le temps qu'il a consacré à la correction de ce manuscrit.

Je remercie Messieurs François Felber et Aboubakry Sarr qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et de faire partie de mon jury en tant que rapporteurs.

Je remercie vivement Messieurs Jacques-Louis de Beaulieu, Bernard Heois et Hervé Van de Sype d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse

Monsieur Hervé Van de Sype a bien voulu collaborer à mes recherches en analysant les précieuses données morphologiques mesurées sur le dispositif FUFRO de la forêt d'Amance, accumulées pendant tant d'années. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Je suis reconnaissante à Jean-Luc Dupouey qui m'a fourni les premières explications sur les analyses factorielles. Je le remercie de l'intérêt qu'il a porté à mon travail et des précieux conseils qu'il m'a prodigués.

Je remercie très sincèrement toute l'équipe d'amélioration des arbres forestiers de l'INRA de Champenoux, Michel Vernier, Fabrice Bonne, Laurent Burnel, Roland Herbeck, Marcel Nassau pour leur sympathie et leur gentillesse, et leur grande efficacité lors des nombreux prélèvements d'aiguilles en forêts. Félicitations pour tous vos tirs réussis !

J'ai eu la chance de travailler toutes ces années passées au laboratoire aux côtés de Marie-France et de Jean-François qui m'ont communiqué toute leur rigueur, leur passion et leur compétence. Marie-France, merci pour ta gentillesse et ton hospitalité lors de mes déplacements à Nancy.

Je n'oublie pas non plus Brigitte et Axelle pour leurs coups de mains lors des extractions d'ADN.

Merci Sylvain d'être arrivé au bon moment, je n'étais enfin plus seule à travailler sur l'Épicéa!

Grand merci également à toute l'équipe du laboratoire de Biologie Forestière pour leur soutien et leur bonne humeur. Je pense particulièrement à Jean Dexheimer, Jean-Claude Dargney, Jean-Pierre, Anas, Bachir, Carole, Patricia, Isabel, Claudine, Valérie, Patricia, Marie-Noëlle, Virginie, Delphine, Fulvio, Alexandra, Aurélien..

Merci à toi Elisabeth pour ton soutien permanent, toutes les discussions que nous avons eues, pour ton exemple de courage et de passion pour la recherche...encore merci

Je pense également,

à Redouane ami et collègue qui a partagé avec moi les bons et les moins bon moments. J'espère que les meilleurs sont à venir...merci à Mériama,

à Jacques pour toute son amitié et son aide précieuse,

à Stéphanie, Bertrand, Julien et Alexandre qui m'ont accueillie chaleureusement pendant toute la durée des corrections,

Mes remerciements vont également à toute ma famille et particulièrement à mes parents pour leur soutien et leur confiance qui m'ont permis d'accomplir ce travail.

Et pour toi Jean-François, qui m'a encouragée et soutenue au quotidien.

INTRODUCTION.....	1
I. Caractéristiques morphologiques, écologiques et répartition de l'Epicéa commun	1
I. 1. Morphologie et écologie	1
I. 2. Aire naturelle.....	3
II. Le rôle de l'histoire dans la répartition actuelle de l'Epicéa	4
II. 1. L'évolution du paysage européen du tertiaire à nos jours	4
II. 1. 1. le tertiaire	4
II. 1. 2. Le quaternaire.....	4
II. 2. Les espèces forestières avant, pendant et après les glaciations en France.....	6
II. 2. 1. A la fin de l'ère Tertiaire	6
II. 2. 2. A l'ère Quaternaire.....	6
II. 2. 2. 1. Pendant les glaciations.....	6
II. 2. 2. 2. Après la dernière glaciation : le postglaciaire.....	7
II. 3. Les zones refuges de l'Epicéa lors des glaciations et sa reconquête de l'Europe.	8
II. 3. 1. Les zones refuges.....	8
II. 3. 2. La reconquête de l'Ouest	9
II. 3. 2. 1. Migration en Europe Centrale	9
II. 3. 2. 2. Migration en Europe du Nord.....	9
II. 3. 2. 3. Différence des vitesses de migration au Nord et au Sud de l'Europe.....	10
II. 4. L'Epicéa en France.....	11
II. 4. 1. Expansion naturelle.....	11
II. 4. 2. L'action humaine	12
II. 4. 3. Les populations autochtones.....	14
II. 4. 3. 1. Comment les définir ?	14
II. 4. 3. 2. Dans les Alpes et le Jura	14
II. 4. 3. 3. Dans les Vosges.....	14
III. Variabilité et diversité de l'Epicéa dans son aire naturelle.....	18
III. 1. Variations morphologiques et physiologiques.....	18
III. 1. 1. Les principaux caractères étudiés	18
III. 1. 1. 1. Les fructifications.....	18
III. 1. 1. 2. Le port et les ramifications.....	18
III. 1. 1. 3. La phénologie.....	19
III. 1. 1. 4. La croissance	20
III. 1. 1. 5. La densité du bois.....	20
III. 1. 2. La structuration de la variabilité génétique	20

III. 2. Variations moléculaires.....	22
III. 2. 1. Les niveaux de diversité des populations d' <i>Epicéa</i>	22
III. 2. 2. Structuration de la diversité génétique et relations génétiques entre populations ..	23
III. 2. 2. 1. Aire totale (Lagercrantz et Ryman 1990).....	23
III. 2. 2. 2. Les populations Italiennes (Giannini et al. 1991).....	24
III. 2. 2. 3. Les populations suisses (Müller-Starck 1995)	24
III. 2. 2. 4. Les populations allemandes de la Forêt Noire (Konnert 1990 et 1991)	24
V. Présentation du travail de thèse	25
Bibliographie	25

CHAPITRE I : RECHERCHE DE MARQUEURS POLYMORPHES ET MÉTHODES STATISTIQUES UTILISÉES..... 32

I. La recherche de marqueurs polymorphes.....	32
I. 1. La méthode RAPD : son principe et ses limites.....	32
I. 2. Optimisation des conditions d'amplification chez <i>Picea abies</i>	33
I. 2. 1. ADN génomique.....	33
I. 2. 2. Sélection des amorces.....	34
I. 2. 3. Les fragments polymorphes retenus	34
II. Les analyses statistiques utilisés.....	35
II. 1. Les analyses phénotypiques	35
II. 1. 1. Les Analyses Factorielles des Correspondances (AFC).....	35
II. 1. 2. Les classifications hiérarchiques ascendantes.....	36
II. 1. 3. Les mesures de diversité.....	38
II. 1. 3. 1. L'Analyse MOléculaire de la Variance (AMOVA).....	38
II. 1. 3. 2. Les indices de diversité de Shannon.....	39
II. 2. Les analyses génotypiques	40
II. 2. 1. Les fréquences alléliques.....	40
II. 2. 2. Les paramètres de diversité et de différenciation génétique de Nei	41
II. 2. 2. 1. La diversité génétique.....	41
II. 2. 2. 2. La différenciation génétique	42
II. 2. 3. La distance génétique entre les populations	42
II. 2. 3. 1. La distance génétique standard (Nei 1972).....	42
II. 2. 3. 1. La distance génétique non biaisée (Nei 1978).....	43
Bibliographie	43

CHAPITRE II : VARIATION À L'ÉCHELLE DE L'AIRE NATURELLE TOTALE	46
Quantitative traits and RAPD variation in Norway spruce (<i>Picea abies</i> (L.) Karst.)	47
I. Introduction.....	47
II. Materials and methods	49
II. 1. IUFRO (1964/1968) testing programme description.....	49
II. 2. Quantitative traits analyses.....	49
II. 3. RAPD analyses.....	51
III. Results.....	52
III. 1. Quantitative traits variation	52
III. 1. 1. General characteristics and environmental effects.....	52
III. 1. 2. Geographical effects	53
III. 1. 3. Geographical structure	53
III. 2. RAPD variation : general pattern and relationship with morphological variation....	55
III. 2. 1. Fragments polymorphism.....	55
III. 2. 2. Diversity	55
III. 2. 3. Geographical structure	55
IV. Discussion.....	57
IV. 1. Geographical structure of variation in Norway spruce.....	57
IV. 2. Quantitative traits vs RAPD variation.....	59
V. References.....	60
Conclusion	64

CHAPITRE III : VARIATION MOLÉCULAIRE DE L'EPICÉA À L'OUEST DE SON AIRE NATURELLE..... 66

Contribution to the postglacial history at the western margin of <i>Picea abies</i> natural area using RAPD markers	67
I. Introduction.....	67
II. Materials and Methods	69
II. 1. Plant Material.....	69
II. 2. DNA extraction	69
II. 3. RAPD analysis	69
II. 4. Data analysis.....	70
III. Results.....	71
III. 1. RAPD variation	71
III. 2. Factorial correspondence analysis (FCA) and cluster analysis.....	71
III. 3. Phenotypic diversity and differentiation	72
IV. Discussion.....	72
IV. 1. Diversity and differentiation	72

<i>IV. 2. Geographical pattern of molecular variation in relation with the presumed postglacial re-immigration routes.....</i>	<i>73</i>
V. References.....	75
Conclusion	80

CHAPITRE IV : VARIATION MOLÉCULAIRE AU SEIN DE QUELQUES POPULATIONS FRANÇAISES : CAS PARTICULIER DES POPULATIONS AUTOCHTONES DES VOSGES **81**

RAPD variation among autochthonous and planted populations of <i>Picea abies</i> from The Vosges Mountains in reference to other French populations.	82
I. Introduction.....	82
II. Material and methods.....	84
<i>II. 1. Plant materials.....</i>	<i>84</i>
<i>II. 2. DNA extraction</i>	<i>84</i>
<i>II. 3. RAPD analysis</i>	<i>84</i>
<i>II. 4. Data analyses</i>	<i>85</i>
<i>II. 4. 1. RAPDs polymorphism.....</i>	<i>85</i>
<i>II. 4. 2. Phenotypic analysis.....</i>	<i>85</i>
<i>II. 4. 3. Genotypic analysis</i>	<i>86</i>
III. Results.....	86
<i>III. 1. RAPDs polymorphism.....</i>	<i>86</i>
<i>III. 2. Phenotypic analyses.....</i>	<i>87</i>
<i>III. 2. 1. Factorial correspondence analysis.....</i>	<i>87</i>
<i>III. 2. 2. AMOVA analysis</i>	<i>87</i>
<i>III. 3. Genotypic analysis.....</i>	<i>87</i>
IV. Discussion.....	88
<i>IV. 1. Significance of RAPD analysis</i>	<i>88</i>
<i>IV. 2. Partitioning of genetic diversity.....</i>	<i>89</i>
<i>IV. 3. Variation within populations</i>	<i>89</i>
V. References.....	90
Conclusion.....	95

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES..... **96**

<i>Bibliographie</i>	<i>99</i>
----------------------------	-----------

INTRODUCTION

I. Caractéristiques morphologiques, écologiques et répartition de l'Epicéa commun

L'ordre des coniférales, désigné dans le langage courant par le terme de "conifères", est de loin le plus important des Gymnospermes. Il comprend sept familles (Araucariacées, Pinacées, Taxodiacees, Podocarpacees, Cupressacees, Cephalotaxacees, Taxacees), une centaine de genres et un millier d'espèces qui occupent une place considérable dans la biosphère. La moitié des forêts du globe sont, en effet, constituées totalement ou essentiellement de Conifères (Debazac 1977, Ozenda 1994).

Le genre *Picea* fait partie de la famille des *Pinacées* au même titre que les genres *Abies* (Sapin), *Pseudotsuga* (Douglas), *Tsuga* (Tsuga), *Cedrus* (Cèdre), *Larix* (Mélèze) ou *Pinus* (Pin). Il est représenté dans l'hémisphère Nord (Europe, Asie et Amérique) par une quarantaine d'espèces (Debazac 1977). En Europe moyenne et septentrionale *Picea abies* est l'espèce prépondérante :

Nom botanique : *Picea abies* (L.) Karst. = *Picea excelsa* (Lam.) Link

[du latin *pix* : poix (allusion au contact poisseux de différentes parties de l'arbre),
excelsus : élevé, grand, et *abies* : ressemblance avec le Sapin]

Nom commun :

- Français = **Epicéa commun**, Sapin de Norvège, Sapin rouge, Pesse, Sérente, Pin pleureur, Sapin à poix, Sapin du Nord, Sapinette, Gentil sapin
- Anglais = **Norway spruce**, European Spruce, Christmas Tree, common Pitch Fir, common Spruce
- Allemand = **Fichte**, Rottanne, Rotfichte
- Italien = **Abete rosso**

I. 1. Morphologie et écologie

L'Epicéa commun est une essence d'ombre modérée, avec une cime pyramidale plus ou moins élargie suivant la densité et l'altitude des peuplements. Il se reconnaît principalement à ses aiguilles quadrangulaires et vertes sur leurs quatre faces, ainsi qu'à ses cônes allongés (10-16 cm) pendant à l'extrémité des rameaux (Jacamon 1987, Rameau *et al.* 1993). Une illustration de ces caractéristiques essentielles est donnée **Figure 1**.

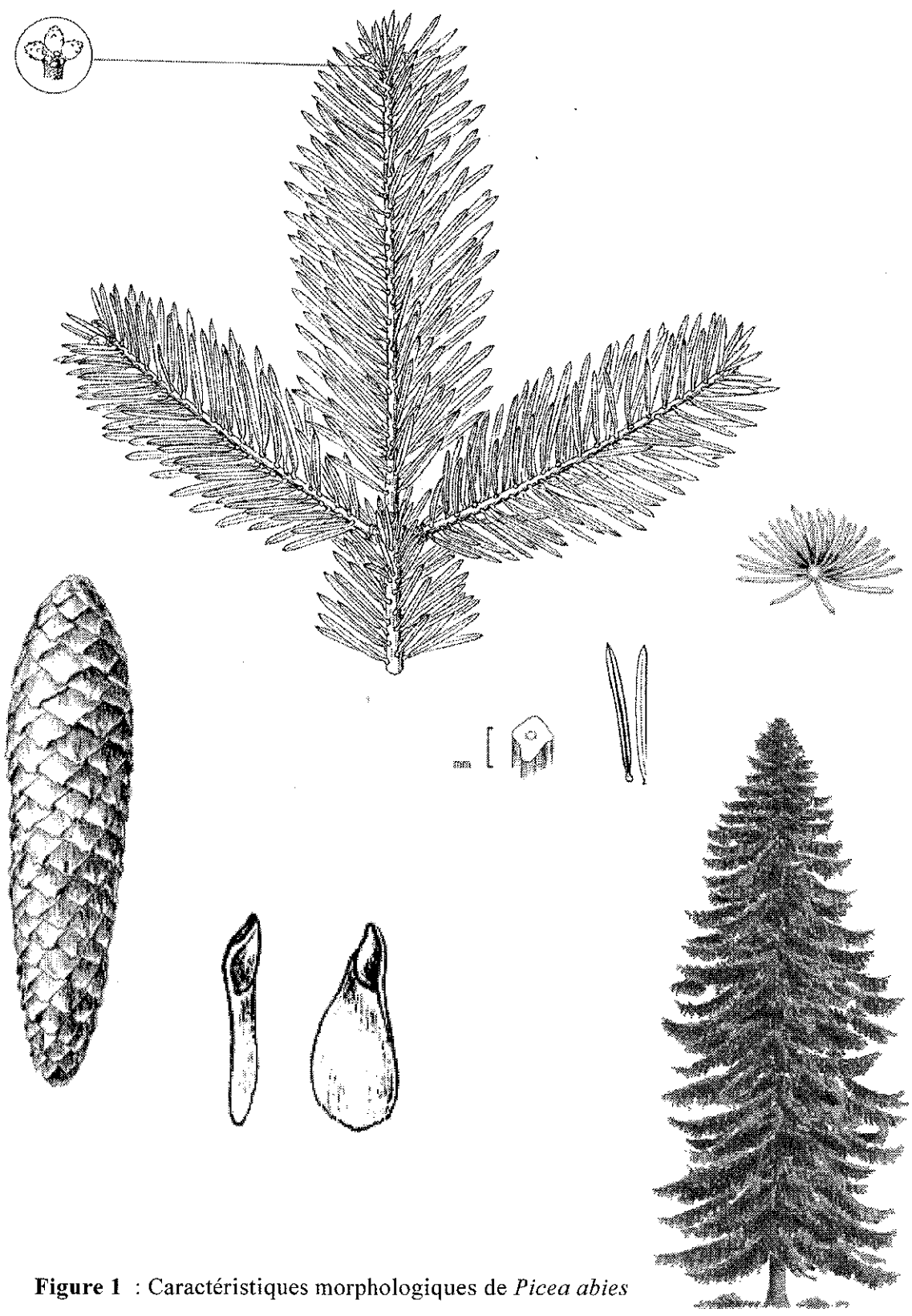


Figure 1 : Caractéristiques morphologiques de *Picea abies*

Sa croissance en hauteur est précoce (dès la troisième année) et se maintient durant toute son existence. Son accroissement en diamètre se ralentit, au contraire, assez tôt (vers 50 ans). Les épicéas de 50 mètres ne sont pas rares (hauteur record de 62 mètres pour un épicéa des Carpathes roumaines) mais, on ne voit qu'exceptionnellement des arbres de diamètre supérieur à 1 mètre (Perrin 1964, Riou-Nivert 1996).

Très plastique, c'est un arbre susceptible de se développer dans des conditions écologiques variées. Il tolère une température moyenne de janvier de $-12,5^{\circ}\text{C}$ (en Laponie), et peut supporter des froids d'hiver atteignant -50°C . Rarement touché dans ses stations naturelles par les gelées printanières, il peut être de temps en temps atteint par les gelées automnales. Dans la partie Nord de son aire, il se contente d'une saison de végétation de deux mois et demi. Au Sud, son extension semble limitée aux régions offrant au moins 120 jours par an de température moyenne inférieure à 0°C . Il redoute les grandes chaleurs d'été (Perrin 1964).

La sensibilité à la sécheresse est, en effet, le trait dominant de l'écologie de l'Epicéa. Il lui faut pour bien croître un état hygrométrique élevé (indice d'aridité de Martonne toujours supérieur à 40), et une pluviométrie suffisante (supérieure à 600 mm), avec en plus un bon ravitaillement en eau l'été. Il est de ce point de vue plus exigeant que le Sapin. Cependant grâce à son extrême souplesse, il peut se maintenir dans des conditions atmosphériques peu favorables si le terrain lui fournit suffisamment d'eau. Nettement plus frugal que le Sapin, mais moins que le Pin sylvestre, il est indifférent à la composition chimique du sol (sauf à une extrême compacité), pourvu qu'il y trouve une fraîcheur marquée (Perrin 1964).

Les exigences de l'Epicéa quant à la fraîcheur du sol tiennent à ce que les racines, largement étalées dans un plan horizontal, restent superficielles et cantonnées dans les couches du terrain les plus exposées au dessèchement. Les racines des vieux arbres ne descendent guère qu'à une trentaine de centimètres (Mathieu 1858 ; Vetvicka et Matousova 1991 ; Lanier 1994).

Comme la plupart des espèces sociales des forêts tempérées, l'Epicéa possède un régime de reproduction à allogamie dominante (moins de 20% d'autofécondation). Sur chaque arbre, ce sont généralement les fleurs femelles, localisées en grande partie dans les parties supérieures de la couronne, qui sont mûres les premières, et, ce n'est que lorsqu'elles ont été fécondées par le pollen venant d'autres arbres que se développent à leur tour les fleurs mâles, plutôt situées dans le bas de la couronne. Ce décalage de maturité des sexes évite l'auto-pollinisation et ses conséquences défavorables (Bouvarel 1974). Les fleurs mâles produisent des quantités de pollen très importantes, telles que le sol à proximité des arbres, peut en être complètement jauni (Vedel *et al.* 1968). Plus de la moitié de la production pollinique d'un arbre est disséminée dans un rayon de 30 mètres. Mais, les grains de pollen qui comportent deux ballonnets aérifères peuvent être transportés par le vent sur de longues distances (Schmidt-Vogt 1986) et être ainsi parfois à l'origine de "pluies de soufre" recouvrant la surface des lacs et des étangs.



Figure 2 : Aire naturelle de *Picea abies* en Europe (d'après Schmidt-Vogt 1986)

La fructification, prévisible par la grosseur des bourgeons à fleurs dès la fin de l'année qui précède la floraison, commence vers 50 ans, et même plus tôt si les conditions stationnelles sont défavorables (10 à 20 ans). Comme chez bon nombre d'arbres, l'Epicéa ne fleurit pas chaque année et les bonnes productions de graines ne surviennent que tous les trois ou quatre ans.

En France, la fructification n'est relativement régulière que dans les régions qui conviennent bien à l'espèce, c'est-à-dire en Savoie et dans le Haut Jura. Ailleurs, et notamment dans les Vosges où l'arbre atteint la limite occidentale de son aire naturelle, elle est assez inconstante et semble plus fréquente aux expositions chaudes.

Les graines, pourvues d'une aile membraneuse (**Figure 1**), sont facilement transportées par le vent sur plusieurs dizaines kilomètres.

I. 2. Aire naturelle

L'aire naturelle de l'Epicéa est très étendue (**Figure 2**). A la fois plus septentrionale et plus orientale que celle du Sapin, elle est habituellement divisée en 3 domaines (Perrin 1964, Schmidt-Vogt 1978, 1986) :

⇒ Au Nord (domaine baltico-nordique), elle englobe la péninsule scandinave, (à l'exception du littoral occidental au sud de Trondheim, des pointes méridionales de la Norvège et de la Suède), et toute la partie de la plaine russe délimitée au Sud par une ligne qui sinue de l'embouchure de la Vistule au grand coude de la Volga. En Scandinavie septentrionale ainsi qu'en Russie centrale et septentrionale, ce domaine baltico-nordique recouvre partiellement l'aire de *Picea obovata*¹ auquel il se raccorde par des formes de transition (Schmidt-Vogt 1978).

⇒ En Europe moyenne et méridionale, elle couvre d'une part les Carpathes et les massifs hercyniens d'Allemagne (domaine hercyno-carpathique), et d'autre part l'ensemble du massif alpin y compris la chaîne des Alpes dinariques et quelques rares stations des Balkans (domaine alpin).

L'aire naturelle française (**Figure 3**) se situe à la limite Ouest de l'aire de l'espèce et se rattache au domaine alpin. L'Epicéa est présent :

– Dans les Hautes Vosges, notamment dans la région de Gérardmer, sous forme de petites populations isolées sur éboulis ou en périphérie de tourbière, à des altitudes comprises entre 600 et 900 mètres, généralement en situation d'exposition froide.

– Dans le Jura, il est abondant entre 800 et 1500 m depuis le rebord du deuxième plateau, où il est mélangé au Sapin dominant, jusque dans les hautes chaînes où il constitue des peuplements presque purs.

¹ *Picea obovata* est une espèce systématiquement très proche de *P. abies* dont elle est parfois considérée comme une sous espèce. Elle s'en différencie par une taille inférieure (moins de 30 mètres), des cônes plus courts et par la présence d'une pubescence sur les jeunes pousses. Son aire s'étend dans tout le nord de l'Eurasie, depuis le nord de la Scandinavie jusqu'au nord de la Mandchourie et à la mer d'Okhotsk.

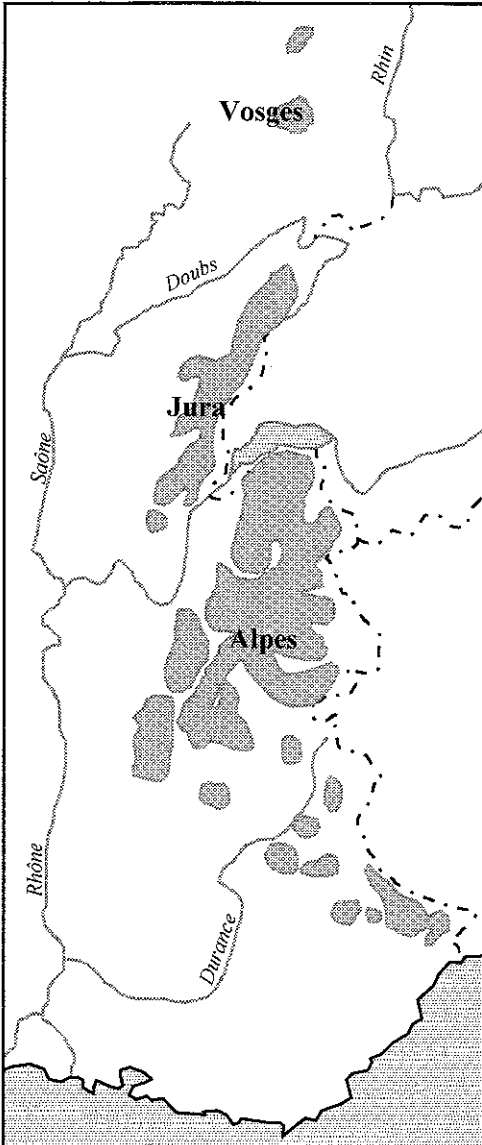


Figure 3 : Aire naturelle de *Picea abies* en France

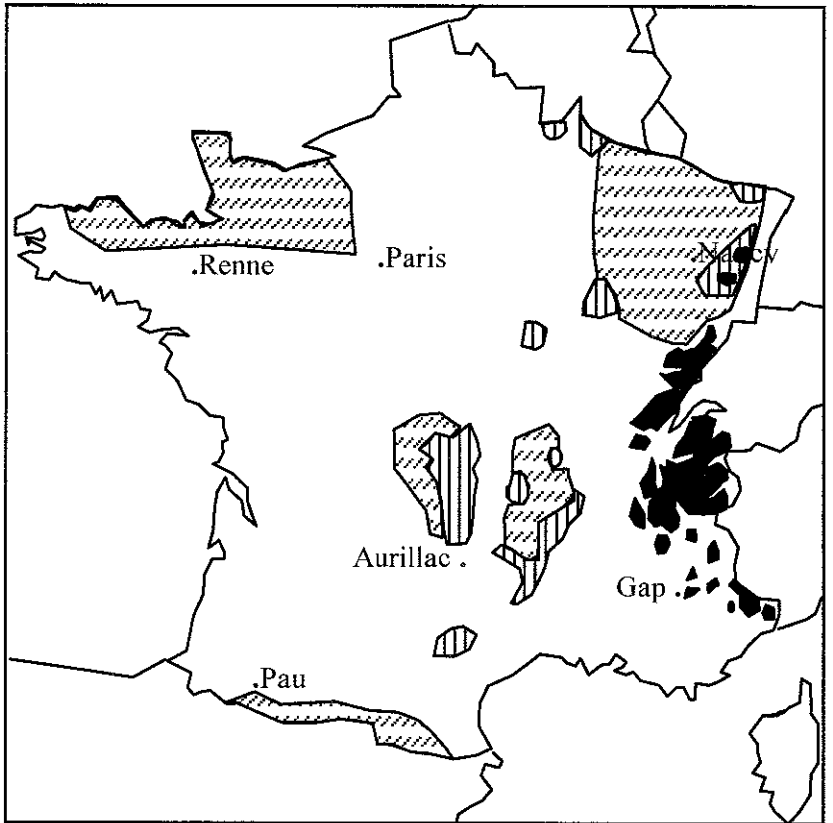


Figure 4 : Carte de répartition de *Picea abies* en France (d'après Jacamon, 1987).

Aire naturelle ■■■■
 Extension artificielle : dominant ▤▤▤▤
 disséminé ▧▧▧▧

- Dans les Préalpes du Nord (Chablais), où il constitue des massifs importants à faible altitude (500 m)
- Dans les Alpes du Nord, aux étages montagnard et subalpin (1000-1800 m), chaque fois que l'humidité atmosphérique est suffisante (Tarentaise, Oisans, Maurienne...)
- Dans les Alpes du Sud (Verdaches, Lantosque...), à l'état sporadique dans des stations relativement humides à assez haute altitude (1500-1800 m)

En outre, depuis 100 à 150 ans, grâce à sa plasticité, l'Epicéa a été largement répandu comme espèce de boisement en dehors de ses stations naturelles (**Figure 4**). Ainsi, on trouve aujourd'hui, d'importants peuplements d'origine artificielle en Normandie, et Alsace-Lorraine ainsi que dans le Massif Central, les Pyrénées et les Ardennes.

II. Le rôle de l'histoire dans la répartition actuelle de l'Epicéa

II. 1. L'évolution du paysage européen du tertiaire à nos jours

II. 1. 1. le tertiaire

Au début de l'ère tertiaire, le climat terrestre était de type tropical à subtropical. Les écarts de températures entre les différentes régions (gradient thermique) semblent avoir été très faibles. Aucun point de la terre n'était vraiment froid. Cependant, avec la dislocation de la Pangée (ensemble soudé de continents de l'hémisphère Nord et Sud) qui a provoqué une redistribution des masses continentales et océaniques ("dérive"), d'importants changements des équilibres climatiques sont apparus. Dans l'hémisphère sud, ceux-ci se sont manifestés par un brutal refroidissement à l'origine de la formation de la calotte de glace antarctique (maximum atteint vers 12 Ma BP²). Dans l'hémisphère Nord qui est resté libre de glace jusque vers 4 Ma BP, les effets du refroidissement ont été beaucoup plus discrets. L'Europe occidentale était alors sous un régime climatique tropical humide avec des températures avoisinant 20 à 26 °C. L'analyse des dépôts tertiaires du bassin parisien indique, par la présence de nombreux coraux et de mammifères marins, un paysage de lagunes ou de mer chaude. Les parties émergées étaient couvertes de forêts luxuriantes ressemblant beaucoup aux sylves actuelles des niveaux élevés de Java ou à certaines formations marécageuses d'Amérique du Sud.

II. 1. 2. Le quaternaire

L'ère quaternaire, débute il y a environ trois millions d'années avec un nouveau refroidissement climatique, affectant à la fois l'hémisphère Nord et Sud (Berger 1992). Vers 2,4 Ma BP les glaces recouvraient toute l'Europe du Nord, et les zones périphériques au sud étaient

² Ma BP millions d'année avant l'époque actuelle, arrêtée à 1950 par convention (BP, Before Present)

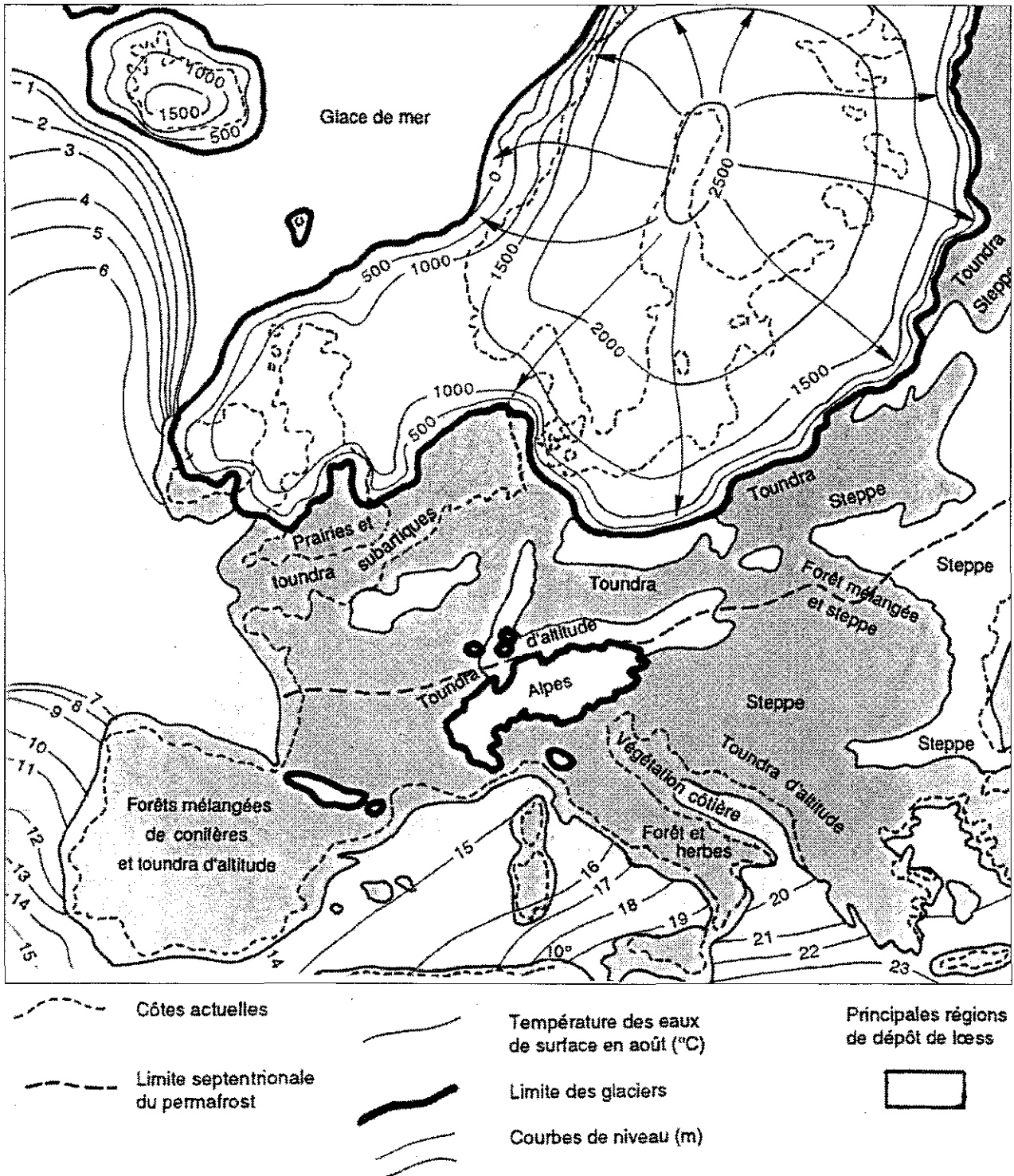


Figure 5 : La limite des glaciers Européens il y a 18 000 à 20 000 ans (d'après Skinner et Porter 1987)

occupées par une végétation de type toundra ou steppe subarctique (Berger 1992 ; Ozenda 1994 ; De Beaulieu et Suc 1985). Le climat a par la suite, oscillé entre des poussées et des reculs glaciaires. Les périodes interglaciaires, généralement de courte durée (10 000 à 15 000 ans), étaient assez comparables au climat actuel, tandis que les périodes glaciaires très longues (90% du temps de l'époque quaternaire) étaient caractérisées par la formation de gigantesques calottes de glace sur le Nord de l'Europe et de l'Amérique, par une baisse du niveau de la mer et par un refroidissement considérable des hautes et moyennes latitudes. Dix-sept cycles glaciaire-interglaciaire ont été ainsi mis en évidence en Europe centrale (Fink et Kukla 1977). Le froid cependant, a atteint son paroxysme lors de la dernière période glaciaire appelée le Würmien (Würm du nom d'un lac et d'un petit ruisseau de la Haute-Bavière, endroits où s'est arrêtée la dernière grande poussée glaciaire venant des Alpes), il y a 18 000 à 20 000 ans (Issler 1953 ; Broecker et Van Donk 1970).

Le grand glacier Nord européen atteignait alors 6 millions de km² (**Figure 5**) et il avait une épaisseur de plusieurs milliers de mètres. Le Nord des plaines polonaises et russes, le nord de l'Allemagne ainsi que le Danemark, le nord de la Grande-Bretagne et l'Irlande étaient recouverts de glace.

Parallèlement, les glaciers de montagnes connaissaient un énorme développement. Des langues de glace, équivalentes à un glacier de 500 x 300 km, dévalaient de part et d'autre des Alpes atteignant, à l'Ouest, l'actuelle vallée du Rhône. Un glacier moins important (300 x 100 km) s'étendait sur les Pyrénées (Denton et Hughes 1981). Les vallées du Jura, des Vosges, de la Forêt-Noire, et du Massif Central étaient couvertes de glaciers en mouvement vers les plaines environnantes. A l'apogée de l'englaciement des Vosges (18 000-20 000 BP)³, la limite des neiges éternelles se situait à environ 800 mètres d'altitude (Meyer 1912). Ailleurs, dans les montagnes du sud de l'Europe, en Espagne, en Corse, en Italie et dans les Balkans, les glaciers étaient assez restreints (Denton et Hughes 1981).

Entre le front glaciaire nord-européen et les massifs montagneux, eux-mêmes recouverts de glace, régnaient des conditions climatiques périglaciaires. La température moyenne du mois de janvier était inférieure à celle d'aujourd'hui d'environ 30°C dans le Nord de l'Europe, et de 5°C à 2,5°C en Afrique du Nord. Au sud de l'Europe où le climat était plus clément, la température de janvier variait de -7°C à +3°C et celle de juillet de 18°C à 25°C (Bennett *et al.* 1991). Les Pays-Bas étaient occupés par une steppe subarctique et à Paris, le paysage était dominé par la toundra (Peterson *et al.* 1979).

Cette situation a été profondément modifiée à la suite du réchauffement climatique survenu à partir de 15 000 BP. La végétation s'est alors engagée dans une reconquête de territoires dévastés par les périodes de froid et de sécheresse et des formations forestières nouvelles se sont

³ Selon Seret *et al.* (1990) cependant, le maximum glaciaire dans les Vosges aurait été atteint beaucoup plus tôt. L'avancée des glaciers aurait été maximale entre 30 000 et 50 000 ans.

reconstituées (Huntley et Birks 1983 ; Davis 1983 ; De Beaulieu et Suc 1985 ; Huntley 1990 ; Bennett *et al.* 1991).

II. 2. Les espèces forestières avant, pendant et après les glaciations en France

La recherche des restes macroscopiques (fruits, feuilles, graines, bois...) et les analyses spore-polliniques ont permis de reconstituer la composition floristique des paysages au cours de l'histoire géologique et notamment au cours du Pliocène et du Quaternaire.

II. 2. 1. A la fin de l'ère Tertiaire

Au Pliocène la flore européenne était riche et diversifiée. En plus des espèces actuellement présentes, on trouvait des espèces méditerranéennes d'Europe orientale (Noyer, Charme oriental, Sapin de Cilicie...), des espèces tropicales (Palmier, Magnolia,...), des conifères américains (Séquoia, Metasequoia, Taxodium, Cryptomeria, Cyprès, Tsuga...), ainsi que des Liquidambars, des Robiniers, des Magnolias, des Cèdres, des Tulipiers, des Carya, des Symplocos...

A cette époque, la flore ne montrait pas de zonation géographique. Les conditions climatiques n'étaient pas limitantes ce qui permettait la croissance en un même lieu de plantes d'exigences diverses (Ehlaï 1968, Ozenda 1994). L'étude d'un gisement d'argile près de Rouen par exemple, a révélé un mélange de pollens appartenant au Pin sylvestre, à des espèces tempérées (Aulne, Noisetier, Bouleau, Chêne) et à des espèces thermophiles (Cyprès, Séquoia, Taxodium, Liquidambar...). Ce type de forêt mixte existe toujours dans le Nord de l'Iran, le Sud de la Chine ou dans le Sud des Etats-Unis.

II. 2. 2. A l'ère Quaternaire

II. 2. 2. 1. Pendant les glaciations

Pendant les glaciations, les espèces thermophiles ou tempérées furent refoulées vers des latitudes plus méridionales, dans des régions non glacées qui leur ont servi de refuges. De multiples espèces d'arbre ont ainsi migré à des vitesses atteignant plusieurs centaines de mètres par an : 2 km/an pour l'Aulne, 1,5 km/an pour le Noisetier, et 500m/an pour le Chêne et l'Epicéa (Huntley et Birks 1983). Mais, tandis qu'en Amérique du Nord cette migration vers le Sud ne rencontrait aucun obstacle géographique, en Europe, au contraire, elle s'est heurtée à la présence de barrières naturelles formées d'une part par la mer Méditerranée, et d'autre part par les chaînes des Alpes et des Pyrénées orientées est-ouest. Ainsi certaines espèces thermophiles adaptées à des climats chauds et/ou humides comme le Séquoia, le Douglas, ou le Tulipier, s'éteignirent complètement et définitivement du continent européen. La pauvreté relative de la flore européenne actuelle par rapport à l'Amérique résulte en partie de ces extinctions (Ehlaï 1968, Campbell 1982, Ozenda 1994).

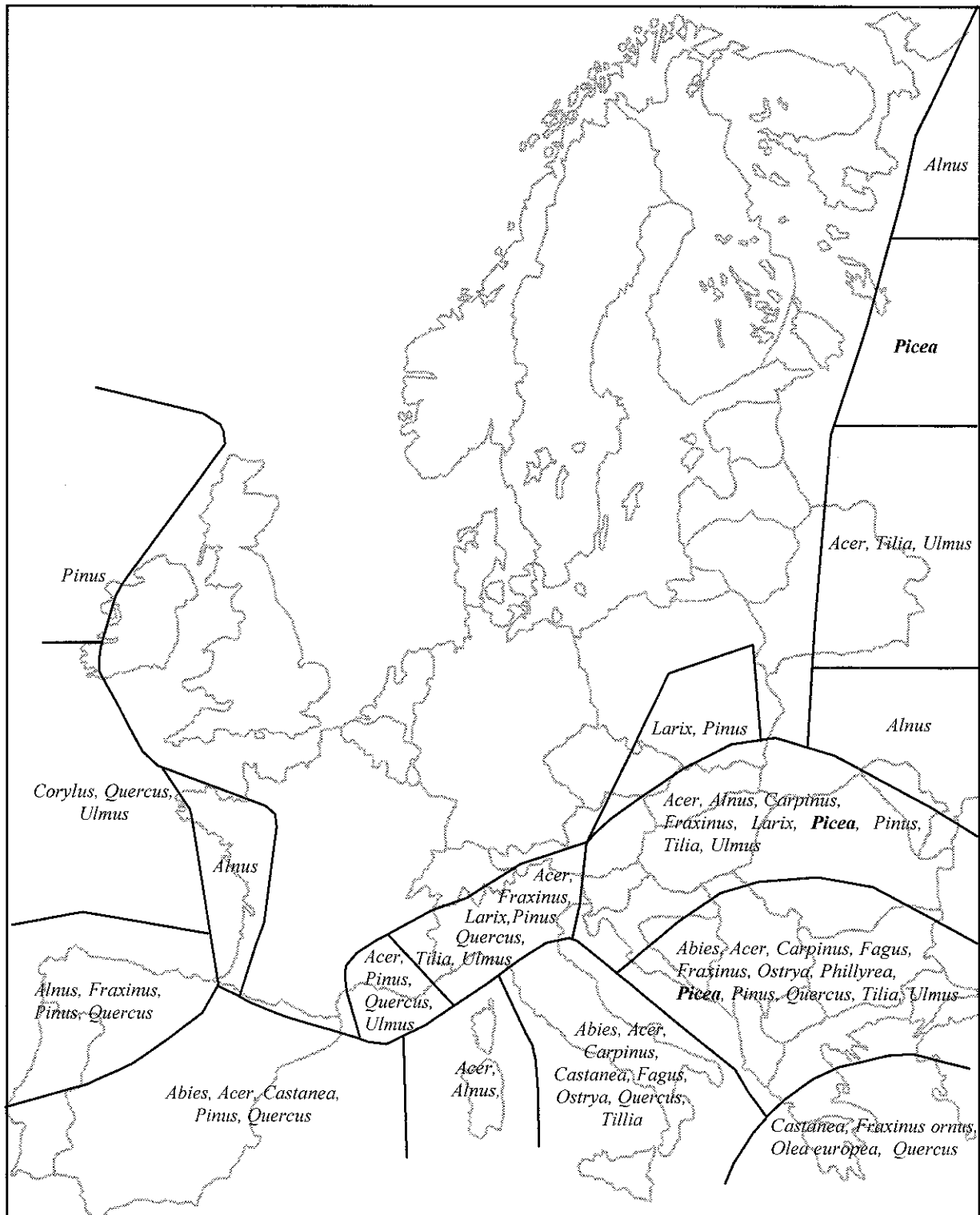


Figure 6 : Distribution du pollen des principaux arbres dans chacune des 17 zones de refuge glaciaire en Europe (d'après Huntley et Birks 1983)

Au début du quaternaire, l'Epicéa prospérait dans le Nord-Est de la France (Lemée 1955, Fliche 1875, 1883), dans la vallée du Rhône, dans les Alpes, dans le Massif Central, en Catalogne et en Aquitaine (Elhaï 1968 ; De Beaulieu et Suc 1985). Sa présence dans les îles britanniques lors des premiers stades interglaciaires suggère qu'il aurait pu trouver refuge dans la partie Ouest de l'Europe, au moment des premières poussées glaciaires (West 1970, 1980).

Il disparaîtra de ces régions bien avant le Pin et n'a pas reparu après le Würm (dernière période glaciaire) dans beaucoup d'entre elles. Cette disparition définitive d'une espèce montagnarde, plastique et très résistante au froid, reste inexplicée (Elhaï 1968). Contrairement à d'autres espèces comme le Noisetier, l'Epicéa n'a sans doute pas été capable de s'adapter aux conditions interglaciaires (West 1980). Ce sont donc probablement les conditions climatiques continentales froides et sèches des périodes interglaciaires moins favorables aux conifères qu'aux feuillus qui ont provoqué son élimination (Wolfe 1978, Davis 1983).

Pendant le maximum glaciaire (vers -20 000 ans), l'Europe s'est trouvée totalement déboisée, à l'exception de quelques aires refuges limitées à des zones, côtières ou de moyenne montagnes, bien exposées et favorables au maintien d'une certaine humidité. Une végétation de type toundra régnait sur l'Europe centrale et seules quelques espèces arbustives capables de supporter les plus grands froids étaient présentes (Bouleau nain et Saule de Laponie) (Elhaï 1968).

II. 2. 2. 2. Après la dernière glaciation : le postglaciaire

Il y a 15 000 ans le climat a commencé à s'adoucir, les glaciers ont reculé vers le nord libérant la Scandinavie, l'Europe du Nord et les Îles britanniques. La fonte des glaces a entraîné une élévation du niveau de la mer de plus de cent mètres (Berger 1992) inondant ainsi toutes ces régions. L'extermination de la flore a été quasi totale et des multiples résineux d'origine, ne subsistaient plus que quelques Pins accrochés aux flancs des montagnes. A partir de 12 000 BP, le niveau de la mer baisse et une phase de reconquête des terres émergées commence. Dans un premier temps, s'installe une flore herbacée très diverse, puis apparaissent des landes à genévriers et enfin des formations arborées (Bouleaux et Pins). Un retour brutal du froid entre -11 000 et -10 000 ans provoqua un regain temporaire d'une végétation steppique. Mais après -9 000 ans (début de l'Holocène), un réchauffement permanent permit la reconquête du territoire d'abord par les feuillus, puis par les résineux (De Beaulieu et Suc 1985 ; Huntley 1988). Cette période est généralement divisée en 5 grandes phases : Le Préboréal (10200-8800 BP), le Boréal (8800-7500 BP), l'Atlantique (7500-4800 BP), le Subboréal (4800-2800 BP), et le Subatlantique (2800 BP-Présent). Chacune d'elle est caractérisée par l'arrivée de nouvelles espèces arborescentes et l'effacement d'autres (Ozenda 1994). Ainsi sur le territoire actuel de la France :

- Au Préboréal, la forêt s'installe à la place des formations steppiques plus ou moins arborées. L'arbre le mieux représenté est un Pin, probablement le Pin sylvestre (*Pinus sylvestris*) qui évince progressivement les bouleaux et les saules nains.

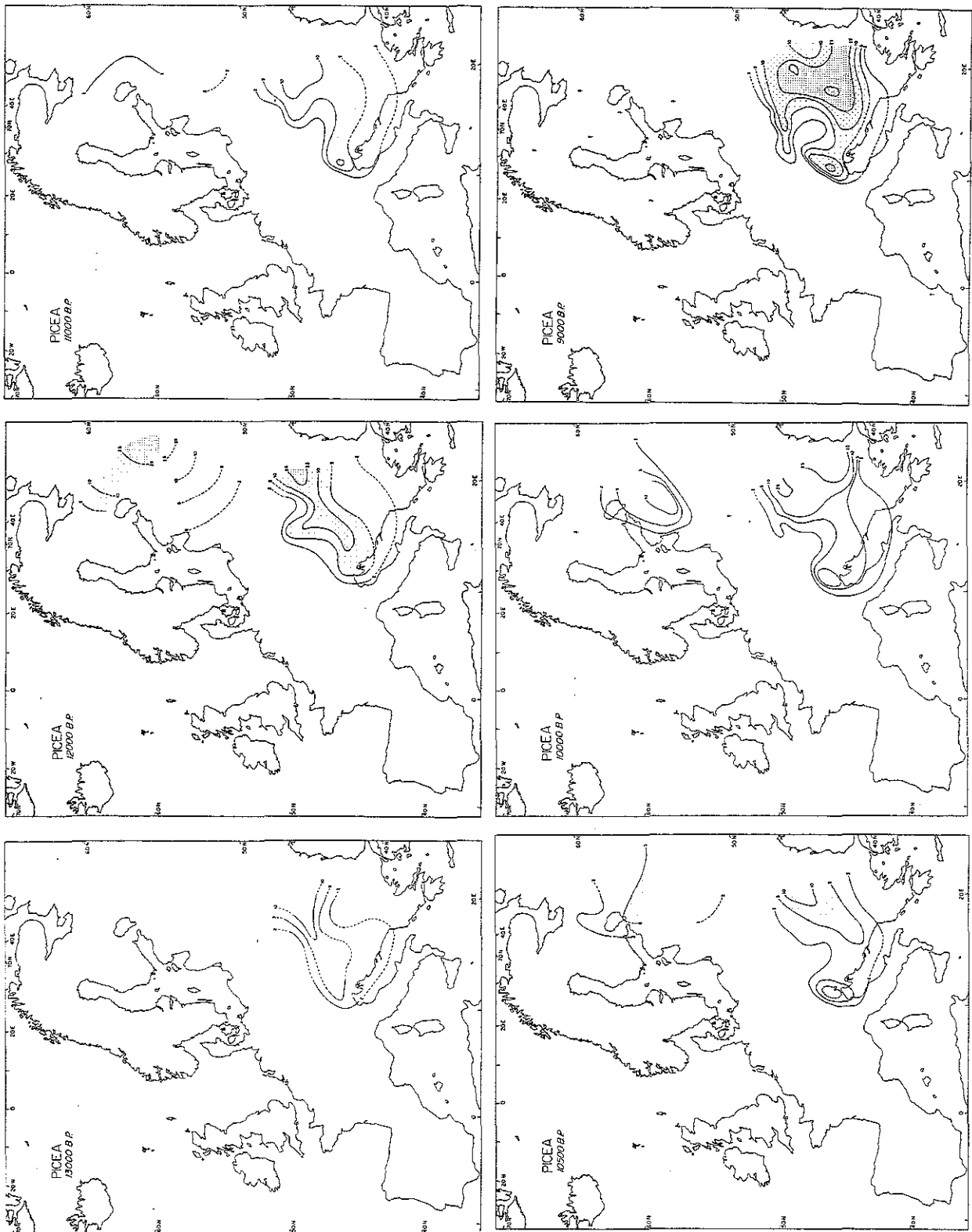


Figure 7 : Cartes isopolliniques de *Picea abies* de 13 000 à 500 BP. Les courbes représentent le pourcentage de pollen (2,5, 10, 25, et 50%) par rapport au pollen total (d'après Huntley et Birks 1983)

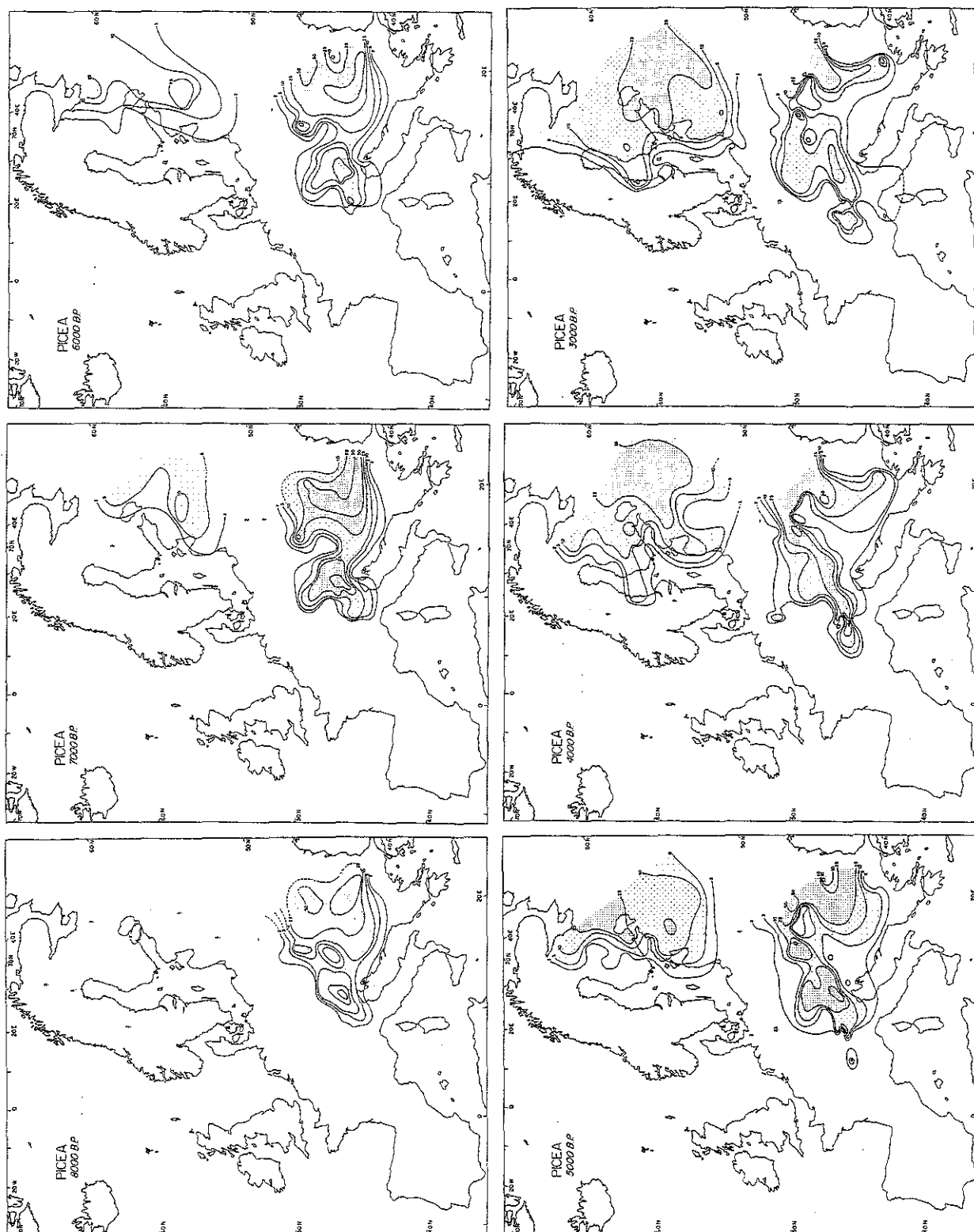


Figure 7 (suite) : Cartes isopolliniques de *Picea abies* de 13 000 à 500 BP. Les courbes représentent le pourcentage de pollen (2,5, 10, 25, et 50%) par rapport au pollen total (d'après Huntley et Birks 1983)

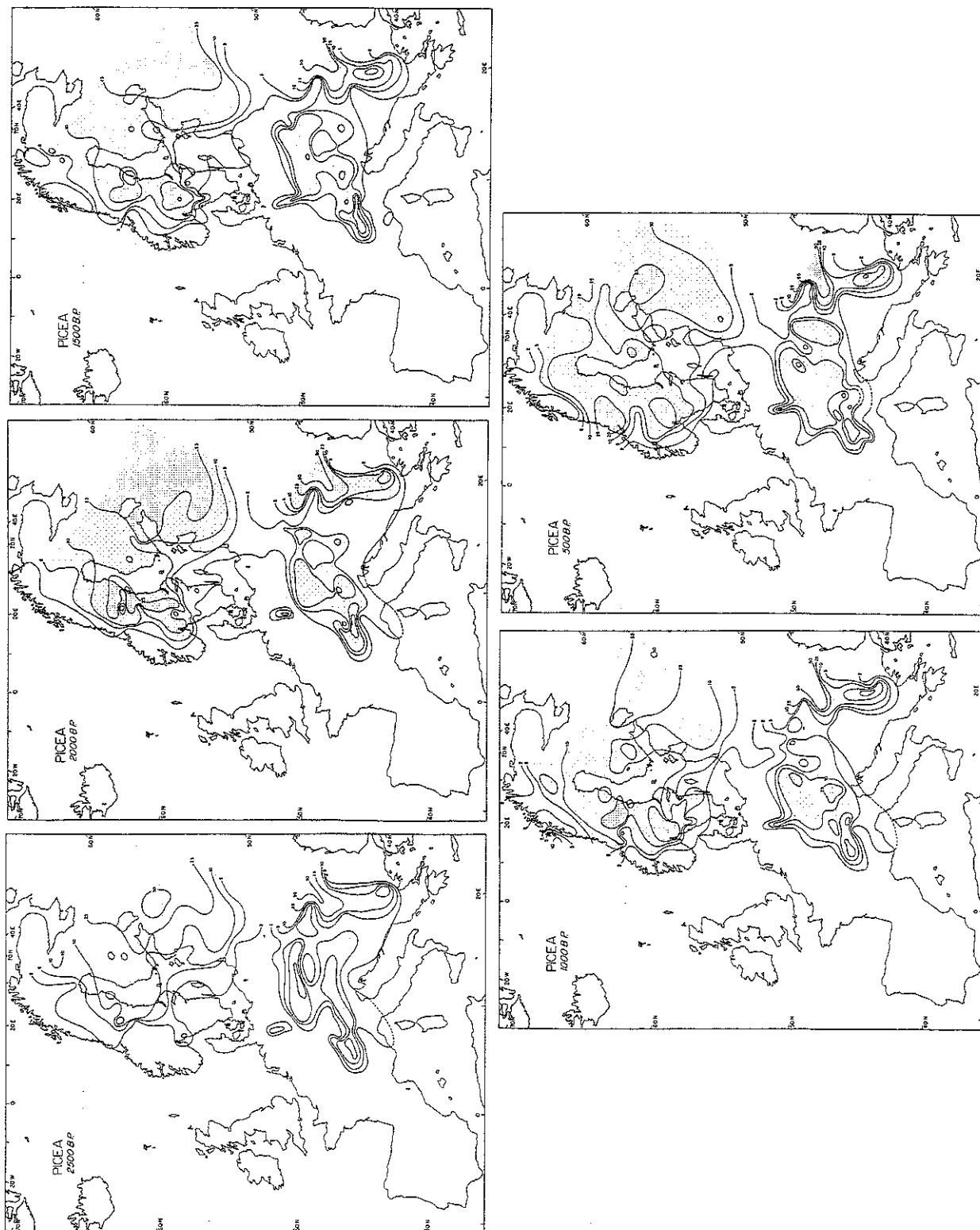


Figure 7 (suite) : Cartes isopolliniques de *Picea abies* de 13 000 à 500 BP. Les courbes représentent le pourcentage de pollen (2,5, 10, 25, et 50%) par rapport au pollen total (d'après Huntley et Birks 1983)

- Au Boréal, le Noisetier (*Corylus*) se répand activement refoulant le(s) Pin(s) sur les hauteurs. Avec le Noisetier, des espèces thermophiles commencent à apparaître l'Orme d'abord, puis le Chêne, et le Tilleul...

- A l'Atlantique, la chaleur et l'humidité augmentent favorisant le développement des chênaies mixtes puis des Aulnaies. Le Bouleau, le Pin et le Noisetier reculent, probablement à cause de la fermeture du couvert.

- Au Subboréal, l'action directe et/ou indirecte de l'Homme sur la végétation commence à se faire sentir. L'Orme régresse, le Hêtre et le Sapin apparaissent.

- Le Subatlantique est caractérisé par le développement des hêtraies et l'expansion du Sapin pectiné dans les Pyrénées, les Alpes, le Jura, les Vosges et le Massif Central. L'Epicéa arrivant de l'Est progresse et livre une concurrence sévère au Sapin dans les hautes chaînes des Alpes et du Jura avant de s'avancer à des altitudes plus basses vers la Forêt-Noire et les Vosges. Il aurait probablement atteint le Massif Central et les Pyrénées si l'Homme n'avait pas anticipé sa progression en l'y introduisant artificiellement.

II. 3. Les zones refuges de l'Epicéa lors des glaciations et sa reconquête de l'Europe.

II. 3. 1. Les zones refuges

Les analyses polliniques ont permis de dénombrer 17 zones (**Figure 6**) où les espèces forestières ont pu se maintenir sous forme de peuplements denses durant les périodes glaciaires (Huntley et Birks 1983 ; Bennett *et al.* 1991). La plupart d'entre-elles se sont ainsi réfugiées dans les régions les plus au sud de l'Europe (Ouest des Balkans, sud des Alpes, péninsule italienne et sud de l'Espagne). Quelques-unes plus résistantes au froid auraient cependant pu subsister à des latitudes supérieures, les *Pinus* en Irlande et les *Alnus*, *Ulmus*, *Tilia*, *Acer*, *Picea* en Russie.

Pour l'Epicéa, l'examen des cartes de répartition du pollen montre une présence significative il y a 12 000 ans (début du réchauffement climatique) dans la région de Moscou, au sud de l'Autriche, au Nord-Ouest de l'ex-Yougoslavie et surtout dans les Carpathes roumaines où cette espèce représente jusqu'à 10% du pollen total (Huntley et Birks 1983) (**Figure 7**). Après le refroidissement substantiel mais bref survenu entre 11 000 et 10 000 BP (Woillard 1978 ; Dansgaard *et al.* 1984), la quantité de pollen d'Epicéa diminue au Nord comme au Sud de l'Europe disparaissant même totalement en Finlande. L'amélioration climatique permanente après 10 000 BP a permis le démarrage d'une expansion vers l'Ouest. Cette expansion a débuté plus tardivement en Europe septentrionale (à partir de 7000 BP) qu'en Europe centrale (à partir de 9000 BP).

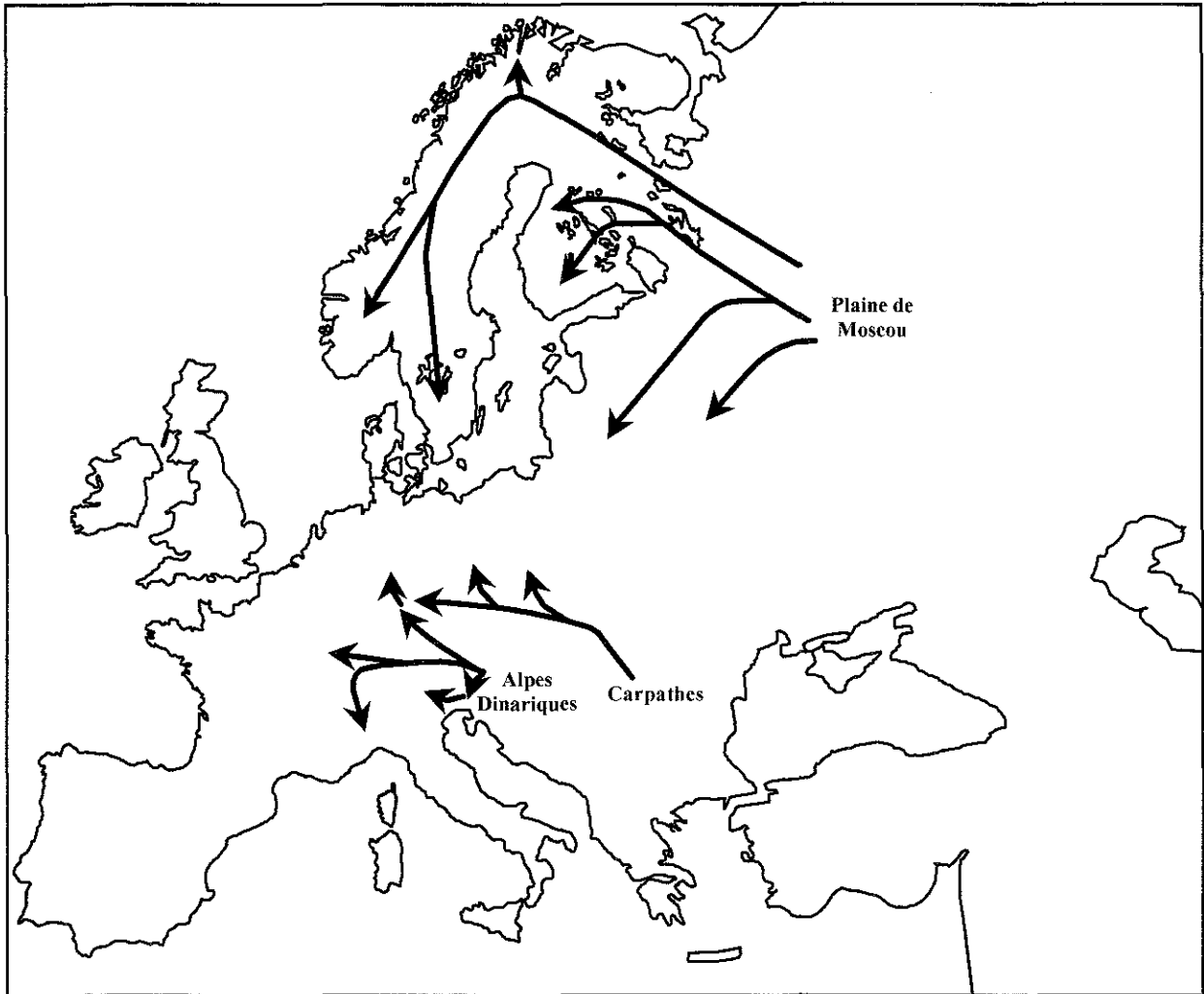


Figure 8 : Chemins de recolonisation postglaciaire présumés de *Picea abies* à partir de trois refuges (d'après Schmidt-Vogt, 1986).

II. 3. 2. *La reconquête de l'Ouest*

II. 3. 2. 1. Migration en Europe Centrale

L'expansion de l'Epicéa commence il y a environ 9000 ans à partir des sites refuges du sud de l'Europe et progresse vers l'ouest (**Figure 7 et 8**). Deux zones d'importance où l'Epicéa représente plus de 50% du pollen total ont été reconnues, l'une située aux pieds des Carpathes (Roumanie) et l'autre au Nord des Alpes Dinariques (Nord de l'ex-Yougoslavie). A partir de ces deux zones refuges, deux voies migratoires principales se sont individualisées et il est probable que les peuplements actuels d'Epicéa des massifs hercyno-carpathique d'une part et de la chaîne alpine d'autre part en sont issus :

- *migration dans la chaîne alpine* : depuis le refuge des Alpes dinariques, l'Epicéa s'est étendu vers l'ouest par les versants sud et nord de la chaîne alpine.

La progression de l'espèce a été rapide en Autriche, s'étendant au nord vers le plateau Bavarois et à l'ouest vers le Tyrol (Bortenschlager 1976) où l'extension de l'Epicéa commence très tôt, il y a plus de 9000 ans. Plus à l'ouest, en Suisse, dans la région du Rhin antérieur (Est du St-Gothard), l'Epicéa devient le constituant majeur des forêts subalpines à partir de 7700 BP (Heitz 1975) puis s'étend au sud dans le Tessin. Il atteint les Préalpes bernoises vers 7000 BP (Heeb et Welten 1972) puis le sud-ouest du Jura et la région du lac de Genève vers 6000 BP (Wegmüller 1966). Mais il n'atteint les Alpes françaises qu'après 4000 BP (Wegmüller 1977), la Forêt-Noire après 3000 BP et les Vosges après 2500 BP (Kalis 1984).

En plus des migrations venant des sites refuges des Alpes dinariques, des populations relictuelles non considérées dans les analyses polliniques (% de pollen trop faible), ont pu aussi participer à l'expansion vers l'ouest de l'espèce. Ainsi, par exemple, un petit refuge supplémentaire identifié dans les Apennins toscans (Ferrarini 1977) a pu être le point de départ de migrations est-ouest et sud-nord sur le versant sud des Alpes (Borghetti *et al.* 1988 ; Giannini *et al.* 1991).

- *migration dans la chaîne hercyno-carpathique* : l'Epicéa prospère dans les Carpathes roumaines durant tout le quaternaire. A partir de ces régions, il colonise rapidement les Carpathes polonaises et slovaques et les massifs hercyniens tchèques et allemands. Depuis 8000 ans, peu de mouvements se sont produits (hormis les plantations massives réalisées en Allemagne depuis 2 siècles).

II. 3. 2. 2. Migration en Europe du Nord

Au Nord de l'Europe, l'Epicéa qui avait disparu de la plupart des sites étudiés (Huntley et Birks 1983) réapparaît significativement vers 7000 BP dans la région de Moscou. Son expansion se produit alors dans trois directions : vers l'ouest en direction des Pays baltes, vers le nord-ouest

en direction de la Finlande (6000 BP), et vers le sud-ouest en direction de la Pologne (**Figure 7 et 8**). Il atteint la Suède vers 4000 BP et la Norvège vers 2500 BP.

Cette chronologie est toutefois sujette à discussion. Les données polliniques ne permettent pas en effet de détecter la présence de populations disséminées (Bennett 1985). En revanche, les récentes découvertes de restes macrofossiles d'Epicéa et leur datation au ^{14}C , ont permis de démontrer la présence de l'Epicéa en Norvège dès 8000 BP (Kullman 1996).

* *
*

On estime que les deux flux migratoires principaux venant de l'Europe du Nord et de l'Europe du Sud se sont rencontrés au Nord-Est de la Pologne il a environ 2000 ans.

Depuis 1000 ans et principalement à cause de l'action humaine, l'aire de l'Epicéa continue à augmenter dans les montagnes de l'Europe centrale alors qu'il décline dans le sud de la Finlande et à l'ouest de Moscou notamment en raison de l'immense pollution industrielle observée dans ces régions.

II. 3. 2. 3. Différence des vitesses de migration au Nord et au Sud de l'Europe

La vitesse d'expansion de l'Epicéa a été différente au Nord et au Sud de l'Europe : limitée à 80-240 mètres/an en Europe centrale, elle aurait atteint 500 mètres/an au Nord. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces différences.

En Europe centrale, la moindre vitesse, particulièrement vers 5000 BP, a été expliquée soit par des perturbations dues à l'action humaine (Markgraf 1970), soit par des fluctuations climatiques (Tallantire 1973).

Cette dernière hypothèse paraît peu crédible dans la mesure où "*les montagnes alpines (...) offrent (à l'Epicéa) un continuum de tranches d'altitudes offrant une variété de milieux telle que les variations climatiques n'ont pu que déplacer très légèrement les limites d'une vaste aire potentielle favorable à sa germination et à sa croissance*" (De Beaulieu et al. 1993).

En revanche, le déclin observé vers 4000 BP, pourrait résulter d'une compétition avec le Hêtre qui est alors en pleine expansion dans les montagnes sous l'effet indirect de l'action humaine (l'augmentation de pollen observée depuis 2000 ans coïncide avec les plantations massives d'Epicéa en plaine ou de régénération après les coupes réalisées précédemment).

Pour ce qui concerne l'Europe du Nord, les diagrammes polliniques sont difficiles à interpréter. Néanmoins, la rapidité de l'expansion semble être en grande partie associée aux variations climatiques survenues au cours de l'Holocène (Huntley et Birks 1983).

Le réchauffement qui s'est en effet produit jusque vers 6000 BP, a sans doute favorisé les espèces thermophiles aux dépens de l'Epicéa qui est resté cantonné principalement dans la région de Moscou. En revanche, le refroidissement qui est survenu après cette date aurait inversé la situation en favorisant nettement l'Epicéa. D'autres auteurs invoquent aussi un effet de l'action humaine qui aurait encouragé l'expansion de l'Epicéa en détruisant les forêts préexistantes. Une autre hypothèse serait que l'Epicéa détecté pendant l'époque tardiglaciaire et celui détecté à l'holocène appartiendraient à deux taxa différents (*Picea obovata* et *Picea abies*). *Picea abies* se serait réfugié plus à l'Est ce qui expliquerait son apparition tardive en Scandinavie (Huntley et Birks 1983).

II. 4. L'Epicéa en France

II. 4. 1. Expansion naturelle

L'Epicéa s'est installé dans les Alpes occidentales suisses, il y a environ 6000 ans. On le retrouve ensuite dans trois zones principales : plus au nord dans les Alpes bernoises, vers l'intérieur dans les Alpes valaisannes et vers le sud dans les Alpes piedmontaises.

Le sud-ouest du massif jurassien a sans doute été colonisé à partir des Alpes bernoises. On note en effet la présence de l'Epicéa dès 7000 BP, entre 1000 et 1200 mètres, dans certaines vallées du Jura français. La véritable expansion de l'espèce débute cependant vers 5000 BP au Nord de la chaîne. Elle progresse ensuite vers des altitudes inférieures. Vers 4900-4500 BP, on la trouve ainsi à 1000 mètres (Richard 1983 ; Reille 1991), puis vers 3500 BP à 900 mètres et enfin vers 3500-3000 BP à 700 mètres (De Beaulieu *et al.* 1994). Les analyses polliniques (Firtion 1950) montrent que l'Epicéa n'a jamais atteint l'Ouest du deuxième plateau (mais il y a été depuis largement planté).

Poursuivant son extension vers le Sud, l'Epicéa apparaît dans le Dauphiné (Vercors, Chartreuse, Dévoluy), en moyenne Maurienne et dans la région de Chamonix au milieu du Subboréal (3700-3000 BP)(Dubois et Dubois 1940, 1945 ; Dubois 1947 ; Wegmüller 1977 ; De Beaulieu *et al.* 1993), puis dans les Alpes duranciennes il y a seulement 2500 ans (De Beaulieu 1977).

Au sud d'une ligne reliant approximativement le col du Rousset, le col du Bayard, et le versant Est du massif des Ecrins dominant la haute vallée de la Durance jusqu'aux cols du Lautaret et du Galibier, l'histoire de l'Epicéa semble différente : "*Quant aux pessières subalpines du Mercantour, leur développement s'explique par la forte pluviométrie du massif dont les caractères phytogéographiques se rapprochent beaucoup des Alpes intermédiaires. Leur histoire n'est pas sans poser de problèmes car les schémas traditionnels montrent Picea migrant depuis les Alpes orientales (où il s'étend au Préboréal) jusqu'aux Alpes occidentales, apparaissant au milieu de l'Atlantique dans le Jura, puis au milieu du Subboréal dans le Dauphiné (3700 BP,*

Wegmüller 1977). Mais *Picea* apparaît plus tôt dans les Alpes maritimes (4700 BP) que dans les Alpes duranciennes (2500 BP), et comme celles-ci constituent une large barrière isolant les Alpes du Nord des Alpes du Sud, *Picea* n'est pas venu du Nord dans celles-ci, et l'on doit envisager, comme dans le cas de *Larix*, l'hypothèse d'un développement à partir d'un noyau relictuel indigène trop petit pour être appréhendé par l'analyse pollinique... *Picea* aurait peut-être migré des Alpes orientales vers les Alpes maritimes par le versant piémontais des Alpes sans pénétrer dans le bassin durancien." (De Beaulieu 1977).

La progression de l'Epicéa s'est achevée en atteignant les Vosges vers 1500-2200 BP, sans doute en provenance des montagnes les plus proches : le Jura (120 Km) et /ou la Forêt-Noire (75 Km) (Hatt 1937 ; Woillard 1978 ; Kalis 1984).

II. 4. 2. L'action humaine

Les massifs montagneux de l'Est de la France, furent fréquentés par l'homme à une époque fort ancienne et nos ancêtres auraient suivi le retrait des glaciers pas à pas (Fourchy 1966). Les premières influences humaines sur la végétation, se traduisant par une réduction des arbres forestiers et une augmentation des graminées dans les diagrammes polliniques, sont datées de 6000-5500 BP dans le Jura, de 5500-4500 BP dans les Alpes (De Beaulieu 1977, De Beaulieu *et al.* 1993) et de 2800 BP dans les Vosges. Toutefois, au-dessus de 1000 mètres, les perturbations anthropiques ont été extrêmement réduites, exceptées dans les Alpes méridionales où l'altitude n'a semble-t-il pas été un obstacle (De Beaulieu 1977). La colonisation humaine aurait même pu dans cette région perturber l'installation massive de la forêt. A partir de 3000 BP, les défrichements deviennent de plus en plus important, et l'on note dans les diagrammes polliniques une nette réduction de la sapinière qui représentait près de 50% des zones forestières (De Beaulieu 1977 ; Bocquet 1987) au profit du hêtre.

L'Epicéa a semble-t-il bénéficié de ces défrichements pour s'installer dans les Alpes occidentales (Markgraf 1970). Très sensible à la concurrence, il occupe les vides laissés par l'exploitation des essences établies avant lui telles que le Sapin (*Abies alba*), le Hêtre (*Fagus sylvatica*), le Pin cembro (*Pinus cembra*), et le Mélèze (*Larix decidua*).

Cantonné aux zones montagneuses, il a pu échapper jusqu'à la révolution aux pillages dont ont été l'objet les forêts de feuillus. Après la révolution le changement du régime de propriété des forêts, la levée des interdits, et les hivers rigoureux provoquèrent la ruée des populations sur le bois. La surface forestière ne représentait plus au début du XIXème siècle que la moitié à peine de celle d'aujourd'hui (6,5 millions d'hectares !!) (Guyot 1886 ; Bourgenot 1977). Le développement très rapide du chemin de fer, des canaux, ainsi que des équipements routiers ont permis de désenclaver les régions les plus reculées et les zones montagneuses ont pu ainsi être mieux exploitées. Les forêts de l'Est se sont trouvées dévastées, et les Hautes-Vosges déboisées

(chaumes). Dans les forêts épargnées les conifères étaient sous représentés (moins de 20%). La politique de reforestation massive menée à partir des années 1830 a permis à la forêt de retrouver un second souffle. L'Epicéa devient alors la première espèce de reboisement dans les principaux massifs français et même en dehors de son aire naturelle.

Après la seconde guerre mondiale, les grands besoins en bois pour la reconstruction et la pâte à papier, ont suscité la plantation de l'Epicéa un peu partout en France (du Tarn aux Ardennes) et en Europe. L'essence présente en effet de nombreux avantages : grande tolérance vis-à-vis du sol, bonne reprise, forte croissance, rectitude du fût, fibre blanche et bonne qualité pour la pâte à papier... Elle fut l'un des fleurons du reboisement des années 60 à 70.

A partir des années 80, l'Epicéa subit quelques déboires (mauvaise adaptation aux sécheresses successives dans les plaines du Centre et de l'Ouest de la France, dégradation des sols et des paysages en raison de la densité trop élevée, mauvaise résistance à la tempête de 1982 dans le massif central, peuplements trop denses et mal éclaircis, attaque des plantations affaiblies par des parasites et des agents pathogènes), qui profitèrent à son concurrent direct introduit d'Amérique au XIXème siècle : le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*).

L'intérêt pour l'Epicéa reste néanmoins important, et bien que les surfaces plantées aient été divisées par dix en 20 ans, il reste toujours la première essence de reboisement en Europe et le troisième résineux français après le Pin maritime et le Pin sylvestre (742 0000 ha, soit 5% des surfaces forestières).

Au-delà de son intérêt économique, l'Epicéa, joue aussi un rôle écologique important. Dans le domaine alpin en effet il occupe massivement, accompagné d'autres résineux, les étages montagnard et subalpin.

Ces zones de moyennes montagnes comptent peu d'espèces arborescentes. L'augmentation de l'altitude entraîne en effet une réduction du CO₂ assimilable, de la vapeur d'eau, de la température d'environ 1°C tous les 100 mètres, ainsi qu'une augmentation de rayonnement lumineux (notamment les U.V.). Ces conditions particulières sont peu favorables aux feuillus, et seuls les résineux très plastiques, au port et au feuillage adaptés s'y sont développés. Cependant les équilibres biologiques et écologiques y sont fragiles et l'on peut s'interroger sur l'avenir des résineux qui y sont présents. En effet, les modèles simulant l'évolution de la végétation en cas de réchauffement climatique (Peters 1990 ; Gravenhorst 1991) concluent tous à une élévation de l'étage des feuillus, actuellement localisés à l'étage collinéen, vers l'étage montagnard. En revanche, si les pâturages alpestres continuent à être aussi intensément exploités, aucune élévation de la limite supérieure de la forêt ne peut être attendue. Il en résulterait donc, une nette diminution de l'aire actuelle de l'étage des résineux (Kienast 1999).

Si l'on ajoute aux effets possibles du réchauffement climatique, les effets directs de la pollution atmosphérique, on comprend les menaces qui pèsent sur certaines essences et plus

particulièrement sur l'Epicéa qui occupe une position sensible. Dans ce contexte, et depuis la tenue d'une conférence à Strasbourg (1990), l'Epicéa fait partie de divers programmes concernant l'évaluation de la diversité génétique, de la structuration géographique, de la gestion de la diversité, de la préservation de populations... La connaissance de ce "réservoir de gènes" est aussi d'un intérêt primordial pour l'améliorateur.

II. 4. 3. Les populations autochtones

II. 4. 3. 1. Comment les définir ?

Les forêts naturelles sont issues de la dynamique de la végétation primaire qui s'est développée en Europe depuis au moins 10 000 ans, à partir de formations pionnières, et qui n'ont subi aucune destruction humaine. Ce type de forêt n'existe plus. En revanche, il existe encore des forêts dites "subnaturelles" c'est-à-dire peu transformées par l'homme (Greslier *et al.* 1995). Elles peuvent être issues soit d'une dynamique de la végétation primaire modifiée par des interventions humaines n'affectant ni leur composition ni leur structure, soit d'une dynamique de végétation secondaire développée après destruction anthropique de forêts naturelles préexistantes. Les populations autochtones peuvent appartenir à ces deux types de forêts.

II. 4. 3. 2. Dans les Alpes et le Jura

Les massifs du Jura et des Alpes ont été depuis fort longtemps fréquentés par l'homme mais les plantations (c'est-à-dire l'introduction de matériel allochtone) y sont assez récentes (XXème siècle). Ainsi, dans leur grande majorité, les populations d'Epicéa sont considérées comme autochtones. Dans les années 1950, elles ont suscité l'intérêt des améliorateurs qui ont entrepris une sélection des meilleures provenances. Quelques dizaines de populations d'élites ont ainsi été sélectionnées sur la base de documents historiques et l'absence de toutes traces de plantations. Les plus beaux arbres de ces populations avaient été choisis pour construire des vergers produisant des graines améliorées (Bouvarel 1956). Le potentiel génétique de ces populations a aussi été évalué au sein de plantations comparatives de provenances afin d'orienter le choix de l'origine des graines en vue de reboisement (Bouvarel 1961 ; Lacaze 1969, 1970).

II. 4. 3. 3. Dans les Vosges

L'action de l'homme sur le paysage forestier dans le massif vosgien commence à être marquée vers 2800 BP avec les premiers défrichements et les premières cultures de céréales. Mais les prélèvements massifs, destinés au développement des villes et surtout à la construction navale française et hollandaise, n'ont commencé qu'à partir du VIème siècle dans un manteau forestier peu entamé jusqu'alors (Berard 1960, 1988).

Catalogue des plantes qui croissent dans la Lorraine et les trois évêchés par PJ Buc'Hoz (1763)

Abies taxi folio fructufurfum fpectante. Tour. 585.
Pinus foliis folitariis emarginatis. Linn. fpec. Plant. 1420. Peffe. Arbre des Vosges.

Cours professés par Lorentz en 1825-1826

Epicéa commun (*a. picea* ou *picea excelsa*).- Cet arbre est appelé "sapin gentil" dans les Vosges. Son bois a les mêmes emploi que celui du sapin mais il est de plus recherché par les luthiers parce qu'il est "sonore"; son chauffage est aussi meilleur que celui du sapin. "Dans les Vosges on l'entaille pour faire écouler la résine qu'on récolte ensuite avec des racloirs de fer; beaucoup d'enfants et de grandes personnes que l'on nomme *pouchards* s'occupe de cette récolte." Il en existe une variété à branches pendantes dans la haute montagne.

Podrome de la flore d'Alsace, par F. Kirschleger (1836)

Abies excelsa, DC. (*Pinus abies*, L.) L'Epicéa. Die Rothianne, Pechianne. Arbre de cent à cent-vingt pieds de hauteur [30 à 40 mètres] ; peu commun dans les Vosges: Vallées de Munster et de Saint-Marie-aux-Mines; forêt d'Obernai, etc.; se trouve aussi dans la rég. Jurassique.

Document 1 : Textes témoignant de la présence ancienne de *Picea abies* dans les Vosges

Au cours du XVIIIème et surtout au XIXème siècle, l'essor des industries du sel, de la verrerie, de la métallurgie a aggravé la surexploitation des forêts (Badré 1983, 1992). Après la guerre de 1871 et l'annexion de l'Alsace et d'une partie de la Lorraine, les Prussiens ont bouleversé les pratiques sylvicoles traditionnelles, en réalisant des coupes rases suivies d'importants enrésinements artificiels, principalement en Epicéa. L'origine géographique du matériel de reboisement utilisé est inconnue, les forestiers allemands ayant pu se procurer des graines aussi bien sur place que dans différentes régions d'Allemagne ou dans l'empire austro-hongrois.

C'est dans ce contexte que s'est engagé un véritable débat scientifique sur la spontanéité de l'Epicéa dans les Vosges (Guinier 1901). Alors que les botanistes et les forestiers de la région considèrent l'Epicéa comme une espèce indigène en s'appuyant sur des archives historiques et des observations écologiques (Fliche 1908 ; Mer 1917 ; Guinier 1959 ; Bouvarel et Jacamon 1959), certains auteurs, principalement allemands, rejettent cette hypothèse au vu de la situation phytogéographique isolée des Vosges et des indications fournies par les premières analyses palynologiques (Oberdorfer 1937, 1957, 1979 ; Hatt 1937 ; Firbas *et al.* 1948 ; Issler 1953 ; Zoller 1956 ; Hartmann 1974 ; Kral 1979).

Aujourd'hui les forestiers et botanistes de la région s'accordent pour admettre l'indigénat de l'Epicéa dans les Vosges. Les arguments sont multiples :

1- Les premiers sont d'ordre historique. La présence de l'Epicéa a été en effet décrite par les botanistes de la région (**Document 1**) dès le début du XVIIIème siècle, époque à laquelle il est improbable que l'essence ait été introduite artificiellement par l'Homme (Marcus Mappus 1742 ; Buc'hoz 1763 ; Lorentz 1825 ; Kirschleger 1836 ; Godron 1843 ; Mougeot 1845 ; Mathieu 1858). En 1908, Fliche écrivait *"Si l'association dont fait partie l'Epicéa dans les Hautes-Vosges est de nature à confirmer la spontanéité de l'espèce plutôt qu'à donner des doutes à son égard, il en est de même de l'état actuel des peuplements qui, dans tous les cas, en admettant une introduction par l'homme, obligeraient à la reporter à une date éloignée, au moins au 17ème siècle. En effet, il s'agit actuellement pour les plus vieux, d'arbres de 150 à 160 ans atteignant 0,80 m de diamètre et de 35 à 40 m de hauteur. D'après mes notes il y avait déjà en 1872, il y a par conséquent 36 ans, des arbres semblables et même plus grands ce qui reporte l'époque de leur naissance à la fin du 17ème siècle... Il serait singulier, en effet, qu'on eut négligé d'introduire cet arbre dans les Basses-Vosges où les bois, à raison des facilités d'extraction, avaient acquis, de bonne heure, sur beaucoup de points, une certaine valeur et où, à raison de la nature du sol, les travaux de semis et de plantation sont le plus souvent très faciles, et qu'on eut procédé, au contraire, à une introduction en grand sur des sols souvent très différents dans un pays alors et pendant longtemps encore d'accès très difficile, où le bois par suite était de si faible valeur qu'au commencement du 19ème siècle encore on négligeait le plus souvent, dans les hautes vallées, l'enlèvement de gros arbres abattus par le vent"*.

L'action de l'homme, à d'ailleurs plutôt consisté à défricher qu'à planter, les belles futaies étant considérées comme gênantes et fort nuisibles aux chaumes jusqu'au début du XVIIIème siècle.

Fliche invoque aussi en faveur de l'indigénat, l'existence dans la région de Gérardmer d'un idiome local désignant l'Epicéa : "Fie". Ce mot n'a aucune analogie avec les termes utilisés couramment dans langage forestier (pesse). Il présente en revanche des analogies avec d'autres noms populaires donnés à l'Epicéa dans le Jura "Fuve" et en Allemagne "Fichte". On le retrouve dans divers noms de lieux boisés : Les Fies, Bois des Fies, Envers des Fies. Le toponyme le plus ancien "Section des Fies" figure dans des documents datant de 1599.

Les premières plantations connues d'Epicéa dans les Hautes Vosges datent de la fin du XVIIIème siècle ; elles ont eu lieu à proximité de Gérardmer qui n'était alors encore qu'un village (Mer 1917). Les plantations en masse n'ont débuté qu'au XIXème siècle : à partir de 1830 en Alsace (Kirschleger 1857), de 1832 en Lorraine (Berard 1988), de 1840 dans les arrondissements de St-Dié et de Remiremont (Mer 1917). Elles ont culminé entre 1870 et 1918 dans la partie des Vosges annexée par l'Allemagne (Guinier 1959).

2- Ces arguments historiques sont confirmés par des données d'ordre écologiques. Des analyses phytosociologiques réalisées dans la forêt de La Bresse et de Gérardmer, ont en effet montré que les unités de végétation particulières qui abritent l'Epicéa indigène sont comparables à celles existante dans le Jura et la Forêt-Noire (Fliche 1908, Bouvarel et Jacamon 1959, Kalis 1984, Tondon 1992). Il s'agit de pessières sur blocs à *Vaccinium vitis idae* (variante sèche), de pessières sur blocs à *Bazzania* (variante fraîche), de sapinière-hêtraie à Epicéa, ou de pessières sur bord de tourbières bombées à sphaignes.

3- Les conclusions définitives ont été apportées par les données palynologiques. Dans la première moitié du XXème siècle, l'analyse des tourbières n'a révélé que rarement du pollen d'Epicéa. *"Il ne paraît pas vraisemblable que l'Epicéa ait pu végéter en quelques points de la montagne vosgienne pendant la dernière glaciation... Comme les autres arbres, il n'a conquis les contreforts vosgiens que lors de leur libération par les neiges et des glaces aux temps tardiglaciaire ou postglaciaire et principalement aux temps proches de nous postérieurement à la phase de la chênaie mixte."* (Hatt 1937). Pour Issler (1953), le pollen d'Epicéa est si peu abondant que sa présence peut être attribuée à un transport aérien à longue distance (Jura, Forêt-Noire, Alpes). Mais de nouvelles recherches menées plus récemment couplant analyse pollinique et datation au ^{14}C (Kalis 1984) ont conduit à des conclusions différentes. Les données ainsi obtenues montrent en effet que l'Epicéa se serait spontanément installé dans la forêt de La Bresse il y a seulement 1500 à 2200 BP. *"...Le pollen d'Epicéa se retrouve dans tous les diagrammes à partir de l'Atlantique (8500-5500 BP). Dans la période 7800-2200 BP, le pollen d'Epicéa est présent, mais avec des pourcentages faibles. Les courbes polliniques ont dans tous les diagrammes des Vosges la même configuration et elles peuvent toutes être mises en relation avec l'histoire de l'immigration de l'Epicéa dans les Alpes... Dans la période de 2200 à 1500 BP,*

Tableau 1 : Populations naturelles d'Epicéa dans les Vosges

Massifs	Propriétés	Superficie (ha)	Classement CEMAGREF
Tour des roches	FC de la Bresse	197	02 PE 001
La Hogle	FC de la Bresse	61	02 PE 002
Le Pré Levant	FC d'Herpelmont	22,6	01 PE 011
Aumontzey	FC d'Aumontzey	26	01 PE 008
Firbacote	FC de Champdray	8,6	01 PE 010
La Moulure	FC de Jurassupt	34	01 PE 009
Granges-sur-Vologne	FC de Grange/Vologne	110	01 PE 006
Val de Senones	FD du Val de Senones	20	/
Gérardmer	FD de Gérardmer	251	01 PE 001
Kichompré	FC de Gérardmer	10,5	01 PE 003
Vologne (Le Kertoff)	FD de Vologne	111	01 PE 002
			Peuplements contrôlés
Nayemont	FC de Xonrupt/Longemer	2	01 PE 015
Basse de l'Eau (Straiture)	FD de Haute Meurthe	146,5	01 PE 005
			- 10 arbres cerclés
			- réserve biologique
Batte Cote	FC de Réhaupal	28	01 PE 013
Bois des Schleffes	FC du Tholy	40,30	01 PE 014
Liezey	FC de Liezey	27,3	01 PE 011
Housseramont	FD d'Housseramont	17,6	01 PE 007
Canon	FD de Gérardmer	2	18 PE 00
Bubensitt	FC de Breittenbach	12	03 PE 004
Stosswihr 1	FC de Stosswihr	47,2	03 PE 002
Stosswihr 2	FC de Munster	65,8	03 PE 003
Kerbholz	FC de Sultzeren	10	03 PE 005

"L'Epicéa donne une courbe pollinique continue dans quelques diagrammes ; Dès 1500 BP, dans le diagramme de la Grande Basse et dès 1200 BP dans celui de Rotried, le pourcentage augmente jusqu'à une valeur sensiblement plus haute que dans les autres diagrammes polliniques des Vosges, ce qui révèle la présence de l'Epicéa dans le voisinage de ces tourbières..." (Kalis 1984).

Les stations autochtones sont généralement situées sur substrat acide, soit sur éboulis soit sur sol tourbeux, et caractérisées par un climat froid (la glace peut subsister en été sous les blocs granitiques) et humide sans risque de sécheresse. Ces stations aux conditions si défavorables, ont sans doute été les seules à être libre lors de l'arrivée tardive de l'Epicéa dans les Vosges, le Hêtre et le Sapin s'étant alors largement répandus.

* *
*

Aujourd'hui, seules certaines stations des Hautes-Vosges peuvent être incontestablement considérées comme spontanées. Ces stations ont été désignées sur la base des relevés botaniques de Baudrillart, Walter (1926), Kirschleger (1857) ainsi que d'après les archives de l'administration des Eaux et Forêts (Guinier 1959). Elles sont limitées essentiellement aux Hautes Vosges en particulier dans la région du Hohneck, à la tête des vallées qui en sont issues sur le versant lorrain, et autour de Gérardmer ou de La Bresse. Elles semblent beaucoup plus rares dans les Basses-Vosges où la présence de populations spontanées n'a été signalée que dans la vallée de Senones. Dans cette région, les habitants le désignaient sous le nom de "Gentil Sapin" pour le distinguer du Sapin proprement dit ; ce terme est aussi utilisé dans les cours de Sylviculture professés en 1825-1826 par Lorentz.

Plus récemment, sur la base des documents historiques et écologiques disponibles, Tondon (1992) a fait un premier inventaire des pessières naturelles du Massif vosgien. Il comptabilise 1250,4 ha disséminés en de multiples petites parcelles. Ces populations figurent pour la plupart dans la liste des peuplements classées pour la récolte des graines par le CEMAGREF (**Tableau 1**). Cet inventaire est cependant loin de pouvoir être exhaustif. Les documents susceptibles de fournir des renseignements sur l'histoire des peuplements ont été en grande partie disséminés voire détruits pendant les guerres franco-allemandes de 1914-18 et 1939-45.

La recherche de stations autochtones est rendue d'autant plus difficile que les preuves de sa spontanéité sont récentes (Kalis 1984). En effet, l'Epicéa a été largement planté en certains points dans le but de compléter ou d'enrichir des massifs forestiers depuis déjà près de 200 ans. Les arbres introduits ayant prospéré, se reproduisant et se propageant aux alentours, il est parfois difficile de savoir si, en une station donnée, l'essence est ou non spontanée (Guinier 1959). Henri Perrin (1964) estime à 20 000 hectares la surface des forêts spontanées d'Epicéa dans les Vosges (contre 113 000 ha dans les Alpes et 38 000 ha dans le Jura).

III. Variabilité et diversité de l'Epicéa dans son aire naturelle

III. 1. Variations morphologiques et physiologiques

III. 1. 1. Les principaux caractères étudiés

D'une forêt à l'autre, d'une région à l'autre, les arbres diffèrent par de multiples caractères concernant à la fois leur fructification, leur port, leur croissance, la qualité de leur bois, etc...

III. 1. 1. 1. Les fructifications

Les cônes allongés et pointus, de 8 à 16 cm de longueur et qui pendent à l'extrémité des rameaux, possèdent des écailles ligneuses généralement losangiques mais à bord supérieur plus ou moins arrondi, tronqué, entier ou denticulé. La morphologie précise de ces écailles peut être décrite à l'aide de caractères tels que longueur, largeur, présence ou absence de pli de chaque côté du sommet et de dent prolongeant le sommet. Dans la plupart des peuplements d'Epicéa les cônes sont très polymorphes. Il existe cependant, des populations dans lesquelles les cônes, et plus particulièrement les écailles, présentent une certaine homogénéité morphologique. Bouvarel (1954), par exemple, mentionne un peuplement du massif du Risoux dans lequel "*... Tous les arbres...portent des cônes dont les écailles présentent une dent très accusée qui donne au cône mûr un aspect hérissé, caractéristique.*"

La couleur des jeunes cônes est également variable. Ainsi, au sein d'un même peuplement, ils peuvent être, suivant les individus, rouges, pourpres ou vert clair. Ce caractère semble lié à l'altitude (Bouvarel 1954, 1956). Dans les peuplements les plus bas du Jura, une majorité d'arbres porte des cônes verts et quelques-uns seulement, des cônes rouges. Au fur et à mesure que l'on s'élève en altitude, la tendance s'inverse et dans les forêts des hautes chaînes, les arbres à cônes rouges deviennent dominants. La couleur rouge pourrait être une adaptation à une forte luminosité : les anthocyanes, à l'origine de cette pigmentation, assureraient la photoprotection des jeunes cônes.

III. 1. 1. 2. Le port et les ramifications

Les variations de longueur, de diamètre et d'angle d'insertion des branches, ainsi que les variations de longueur et de disposition des ramules sur les branches, confèrent aux arbres des ports spécifiques. Les Epicéas peuvent être ainsi classés en plusieurs types :

- le type "peigne" ou "draperie" caractérisé par la présence de branches principales et de ramules longues, pendantes et disposées dans un plan vertical,
- le type "brosse" possédant des branches principales courtes, à peu près perpendiculaires au tronc dans la partie supérieure de la cime et des ramules courtes insérées tout autour des branches,



Figure 9 : Epicéa colonnaire autochtone des Vosges

- le type "columnnaire" avec des branches principales fines et pendantes favorisant un bon élagage naturel,
- le type "pendulaire" avec des branches principales longues et pendantes.

D'après les observations réalisées dans le Jura français (Bouvarel 1954, 1956), la fréquence de ces différents types dépend de l'altitude. Dans les peuplements de basse altitude (800 mètres), les Epicéas, noyés dans la masse énorme des Sapins, sont des arbres à cime ample, à branches robustes et étalées, à longues ramules pendantes (type "draperie"). Ils possèdent une masse d'aiguilles importante qui permet une croissance forte. Progressivement, avec l'augmentation de l'altitude, le Sapin régresse, l'Epicéa progresse et, mêlés aux arbres à branches longues et ramules pendantes, apparaissent en proportion croissante des individus à cime étroite et à branches fines, hérissées de ramules plus courtes (type "brosse"). Enfin, sur les hautes chaînes, on trouve des peuplements purs à cime étroite, soit à branches courtes et fortes (type "brosse"), soit à branches fines et pendantes (type "columnnaire").

Cette évolution vers des formes à ramules courtes et à cimes étroites s'explique par les contraintes climatiques. En altitude en effet, les arbres à cime large sont défavorisés car ils sont plus sensibles à l'action du vent, ainsi qu'au poids de la neige ou du givre. En revanche, dans les forêts de basse altitude, les Epicéas à cime étroite sont dominés par les arbres à large cime qui poussent plus vite en raison, notamment, de leur plus grande quantité d'aiguilles (Bouvarel 1974).

L'effet des contraintes dues au vent, au givre et à la neige se manifestent également dans les plaines de Scandinavie, où il est fréquent de rencontrer des Epicéas à cime étroite de forme "pendulaire" (Kärki 1980 ; Schmidt-Vogt 1986 ; Pöykkö et Pulkkinen 1990). Un exemplaire de ce type, qualifié d'Epicéa "quenouille", a été découvert dans le Jura par Bouvarel (1954). Le port "pendulaire" serait contrôlé par un simple gène dominant (Lehner *et al.* 1995).

Enfin, dans les Vosges, "*il (...) existe une variété à branches pendantes dans la haute montagne*" (Lorentz 1825). Cette forme dite "columnnaire" (**Figure 9**) est typique des populations indigènes qui sont situées sur éboulis ou en zones tourbeuses exposés aux froids. L'expression de ce caractère s'accroît avec l'âge. Les plus beaux spécimens se trouvent parmi les populations du canton du Kertoff près de Gérardmer. Ils dépassent 50 mètres de hauteur et 2,50 mètres de circonférence. Le déterminisme génétique de la forme "columnnaire" est très probablement complexe tant il existe d'intermédiaires avec les autres formes.

III. 1. 1. 3. La phénologie

Lorsque l'on relève en plantation comparative les dates de débourrement de diverses provenances, on constate qu'il existe d'importantes différences liées à l'altitude d'origine des arbres. En altitude en effet, le printemps arrive tardivement mais brusquement et, en général, sans retour offensif du froid et des gelées tardives ; le seuil thermique de débourrement est bas et les arbres sont précoces. Les provenances de basse altitude par contre sont tardives : le climat de

plaine au printemps est infidèle ; des gelées tardives surviennent fréquemment et favorisent les génotypes à débourrement tardif. A moyenne altitude le débourrement dépend beaucoup de la topographie du terrain (Lacaze 1969, 1970). En comparant par exemple les forêts de Gérardmer (Vosges) et de Bonnetage (Jura) situées à des altitudes à peu près égale, Bouvarel (1974) a montré que la première, située sur des éboulis où les gelées tardives sont rares, est très précoce, alors que la seconde localisée sur un plateau où l'on constate fréquemment des dégâts importants dus au gel, est tardive.

Des phénomènes analogues semblent intervenir lors de l'arrêt automnal de la croissance. Les arbres à arrêt tardif peuvent être exposés aux gelées précoces. Il semble que la photopériode est impliquée. La diminution de la durée des jours à l'automne pourrait jouer en effet le rôle d'un signal qui "avertit" les arbres de l'approche des froids d'hiver (Bouvarel 1961).

Des variations phénologiques s'observent également dans la date d'aoûtement. Certains peuplements situés dans les Alpes du Sud, par exemple, présentent un aoûtement précoce (ou arrêt précoce de croissance). Ce phénomène est probablement le résultat d'une adaptation à la saison estivale particulièrement sèche dans cette région (Bouvarel 1961).

III. 1. 1. 4. La croissance

La croissance en hauteur et en diamètre dépend principalement des conditions climatiques et photopériodiques et donc indirectement de la précocité et de la tardiveté des arbres. Ainsi, les provenances de régions à saison de végétation courte croissent moins vite que les autres. Les populations ayant les plus grandes capacités de croissance proviennent de l'Est des Carpathes et des montagnes Bihar en Roumanie (Kruttsch 1992).

III. 1. 1. 5. La densité du bois

La qualité du bois, variable selon les provenances, est généralement évaluée indirectement par des mesures de densité. Celle-ci est directement corrélée à la résistance mécanique ainsi qu'au rendement en fibres. Les résultats obtenus à l'aide d'expériences multi-sites ont montré que les provenances les plus tardives (les plus vigoureuses) ont généralement le bois le moins dense (Thiercelin 1970).

III. 1. 2. La structuration de la variabilité génétique

Outre leur intérêt pour les forestiers, les caractères morphologiques et physiologiques peuvent aussi apporter des informations sur la structuration de la variabilité naturelle.

Au niveau de l'aire totale de l'espèce, les premiers résultats ont été obtenus à partir de l'expérience internationale IUFRO installée depuis 1968 en forêt d'Amance, près de Nancy (Ruffieux 1996). Les mesures réalisées sur plusieurs années, au niveau de la mortalité, de la croissance (hauteur, circonférence), de la phénologie (date d'arrêt et de reprise de la croissance)

et de la qualité du bois, ont révélé 4 groupes de provenances correspondant à des zones géographiques (plaine/montagne) et climatiques (boréale, continentale, semi-continentale, méditerranéenne...) bien définies:

- Les provenances russes,
- Les provenances scandinaves,
- Les provenances d'Europe centrale,
- Les provenances du sud de l'Europe.

L'existence de ces quatre groupes de provenances est cohérente avec les hypothèses émises concernant la reconquête postglaciaire de l'Europe à partir de plusieurs refuges situés respectivement dans la région de Moscou, dans les Carpathes et dans les Alpes dinariques.

Dans les conditions écologiques des plaines du Nord-Est de la France, les provenances des régions les plus au nord ou les plus au sud de l'aire sont relativement médiocres pour la mortalité, la croissance, le débourrement, mais présentent un bois plus dur que les autres. En revanche, les provenances d'Europe centrale (Pologne du sud, République tchèque, Slovaquie, Autriche) sont plus performantes en terme de croissance mais leur bois est de moins bonne qualité (moins dense).

Ces résultats ont en grande partie été confirmés par l'étude d'une autre expérience IUFRO installée en Suède (Lagercrantz et Ryman 1990). Cette expérience ne contenait cependant pas de provenances de sud de l'Europe.

D'autres études plus localisées ont été aussi réalisées. Borghetti *et al.* (1988) par exemple, utilisant une combinaison de caractères issus de l'examen approfondi des écailles des cônes ont mis en évidence une bonne discrimination entre les populations toscannes autochtones et introduites. L'analyse révèle également que les populations italiennes de la chaîne alpine sont ordonnées suivant un gradient longitudinal, confirmant une migration postglaciaire d'est en ouest depuis les Balkans. La forte affinité observée entre les populations autochtones toscanes et celles de la vallée d'Aoste suggère une voie de recolonisation postglaciaire nord/sud.

Des populations d'origine norvégienne et bulgare, introduites dans l'analyse à titre de référence, forment des groupes séparés confirmant des chemins de recolonisation différents. Les auteurs concluent que les populations italiennes sont plus hétérogènes que les populations nordiques.

Tableau 2 : Diversité génétique dans les espèces, dans les populations et entre les populations de différents genres de plantes ligneuses (d'après Hamrick *et al.* 1992).

	N ¹	Nombre moyen de populations	Nombre moyen de loci	Hes	Hep	Gst
<u>Gymnospermes</u>						
<i>Abies</i>	7	5,4	13,6	0,145	0,130	0,063
<i>Picea</i>	28	9,4	12,2	0,219	0,218	0,055
<i>Pinus</i>	93	7,8	19,9	0,136	0,136	0,065
<i>Pseudotsuga</i>	11	15,5	15,5	0,163	0,163	0,074
<u>Angiospermes</u>						
<i>Acacia</i>	13	2,6	21,4	0,125	0,096	0,206
<i>Eucalyptus</i>	14	8,8	14,2	0,187	0,172	0,169
<i>Populus</i>	10	9,0	24,0	0,161	0,154	0,041
<i>Prosopis</i>	13	1,2	17,5	0,186	0,098	0,072
<i>Quercus</i>	28	5,5	17,5	0,186	0,109	0,107
<i>Tetramolopium</i>	6	3,2	22,0	0,013	0,008	0,199

¹N, nombre d'entrée ; Hes, diversité génétique dans l'espèce ; Hep, diversité génétique dans populations ; Gst, proportion de diversité génétique entre les populations.

III. 2. Variations moléculaires

Le développement des marqueurs moléculaires a profondément modifié les recherches concernant la diversité génétique des végétaux. En permettant de s'affranchir des effets environnementaux, ces marqueurs ont été à l'origine d'un raccourcissement considérable des délais d'étude. En même temps, ils ont donné accès à des données essentielles telles que la présence des allèles rares, le pourcentage des hétérozygotes, la structuration de la diversité, les distances génétiques entre populations, les systèmes de reproduction etc....

Chez l'Epicéa commun, les marqueurs utilisés ont été jusqu'à très récemment presque exclusivement basés sur le polymorphisme enzymatique. Une même enzyme peut exister sous plusieurs formes provenant soit de locus différents (isozymes) soit d'un même locus (allozymes). On sait révéler plusieurs dizaines de systèmes enzymatiques, mais tous ne sont pas génétiquement variables. En général, pour une espèce donnée le nombre de systèmes polymorphes varie entre 10 et 20. Parmi les plus couramment utilisées, on trouve : la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), la Glutamate déshydrogénase (GDH), l'Isocitrate déshydrogénase (IDH), la Leucine aminopeptidase (LAP), la Malate déshydrogénase (MDH), la 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH), la Shikimate déshydrogénase (SKDH) ou la Glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT).

Les paramètres de diversité généralement estimés sont les paramètres proposés par Nei (1987) : H, indice de diversité ou taux d'hétérozygotie et G_{st}, différenciation génétique (part de diversité inter populations par rapport à la diversité totale)

III. 2. 1. Les niveaux de diversité des populations d'Epicéa

La plupart des données disponibles chez l'Epicéa (Krutovskii *et al.* 1995 ; Lagercrantz et Ryman 1990 ; Bergmann et Gregorius 1979 ; Konnert 1991 ; Müller-Starck 1995 ; Giannini *et al.* 1991 ; Gömöry 1992 ; Muona *et al.* 1990 ; Lewandowski *et al.* 1997 ; Goncharenko *et al.* 1995) révèlent des niveaux de diversité élevés, deux fois supérieurs à ceux de la plupart des autres plantes, mais comparables aux données obtenues chez d'autres espèces forestières feuillues ou conifères (Hamrick *et al.* 1992 ; Müller-Starck *et al.* 1992). Cette importante diversité peut être attribuée en partie à la grande taille des populations ainsi qu'au régime de reproduction presque exclusivement allogame (autofécondation très faible) de l'espèce.

Comme chez toutes les espèces à vaste aire de répartition, les populations d'Epicéa sont dans l'ensemble très peu différenciées (G_{st} = 0,05 **Tableau 2**), l'essentiel de la diversité (~95%) se trouvant à l'intérieur des populations.

Les résultats des diverses études isoenzymatiques accessibles chez l'Epicéa commun sont rassemblés dans le **Tableau 3**. La valeur moyenne du taux d'hétérozygotie pour l'ensemble des populations est de 0,21. Selon les populations et/ou les auteurs d'importantes variations peuvent être observées. Par exemple, les populations allemandes étudiées par Lagercrantz et Ryman (1990)

Tableau 3 : Valeurs des indices de diversité génétique (Nei 1973) des populations de *Picea abies* étudiées avec des isozymes : données bibliographiques.

	Lat	Long	Altitude	Nombre ind/pop	Nombre enz	Nombre loci	He	
<i>France</i>	46°	6°6	13000	44	12	22	0,10	Lagercrantz et Ryman, 1990
<i>Allemagne</i>	48,3	8,9	800	41	12	22	0,08	
	47,7	10,1	850	33	12	22	0,09	
	47,6	13,0	1100	43	12	22	0,09	
	51,8	10,6	725	44	12	22	0,08	
	49,1	13,2	1200	42	12	22	0,08	
	54,6	13,7	92	42	12	22	0,08	
	49,1	13,2	650	41	12	22	0,08	
	51,7	10,5	-	100*	14	26	0,19	Krutovskii <i>et al.</i> , 1995
	51,8	10,5	800	20-30	5	7	0,42	Bergmann et Gregorius 1979
	51,7	10,2	180	20-30	5	7	0,41	
	49,0	13,2	900	20-30	5	7	0,44	
	48,7	8,4	550		6	8	0,26	Konnert, 1991
	48,6	8,6	600		6	8	0,22	
	48,7	8,6	650		6	8	0,26	
	48,6	8,4	760		6	8	0,26	
	48,6	8,5	620		6	8	0,25	
	48,6	8,5	590		6	8	0,25	
	48,5	8,2	920		6	8	0,20	
	48,5	8,5	740		6	8	0,31	
	48,6	8,3	580		6	8	0,26	
	48,5	8,3	800		6	8	0,26	
	48,5	8,2	920		6	8	0,24	
	48,5	8,1	990		6	8	0,26	
	48,3	8,3	580		6	8	0,25	
	48,4	8,5	570		6	8	0,21	
	48,4	8,5	540		6	8	0,23	
	48,4	8,4	740		6	8	0,26	
	48,4	8,3	810		6	8	0,24	
	48,7	8,6	680		6	8	0,25	
	48,6	8,7	460		6	8	0,26	
	48,4	8,3	800		6	8	0,23	
	48,3	8,3	720		6	8	0,25	
	48,0	8,0	870		6	8	0,23	
	48,0	8,0	830		6	8	0,24	
	48,2	8,0	560		6	8	0,24	
	48,4	8,1	740		6	8	0,29	
	47,8	8,1	1010		6	8	0,26	
	47,8	8,0	900		6	8	0,22	
	47,8	8,0	940		6	8	0,23	
	47,8	8,0	950		6	8	0,24	
	47,8	8,0	1000		6	8	0,24	
	47,9	8,0	1130		6	8	0,23	
	47,9	8,2	950		6	8	0,23	
	48,0	8,4	850		6	8	0,24	
	48,1	8,4	880		6	8	0,21	
	48,2	8,3	830		6	8	0,30	
	48,1	8,3	790		6	8	0,19	
	48,1	8,4	740		6	8	0,22	

Tableau 3 (suite)

	Lat	Long	Altitude	Nombre ind/pop	Nombre enz	Nombre loci	He	
<i>Allemagne</i>	47,8	8,3	810		6	8	0,24	
	47,8	8,2	990		6	8	0,24	
	48,2	8,0	710		6	8	0,29	
<i>Suisse</i>	46°4	6°3	1180	100	13	18	0,30	Müller-Starck, 1995
	47°0	6°3	1120	100	13	18	0,25	
	46°0	7°0	1300	100	13	18	0,28	
	46°1	7°3	1260	100	13	18	0,27	
	46°1	7°5	1460	100	13	18	0,25	
	46°4	8°0	1400	100	13	18	0,25	
	46°4	8°0	1750	100	13	18	0,26	
	46°2	8°0	1650	100	13	18	0,27	
	46°1	8°2	1500	100	13	18	0,26	
	46°5	8°2	1700	100	13	18	0,26	
	46°3	9°0	1450	100	13	18	0,27	
	46°2	9°0	1500	100	13	18	0,25	
	47°0	9°0	1500	100	13	18	0,26	
	46°5	9°2	1580	100	13	18	0,29	
	46°2	9°2	1630	100	13	18	0,26	
	46°1	9°4	1350	100	13	18	0,28	
	46°2	9°4	1580	100	13	18	0,27	
	47°0	9°5	1700	100	13	18	0,25	
	46°1	10°0	1500	100	13	18	0,26	
	46°1	10°2	1500	100	13	18	0,27	
	46,8	9,8	1700	20-30	5	8	0,38	Bergmann et Gregorius, 1979
	46,7	7,2	1200	20-30	5	8	0,42	
	47,7	9,2	520	20-30	5	8	0,36	
<i>Autriche</i>	47,4	10,7	1370	49	12	22	0,09	Lagercrantz et Ryman, 1990
	46,8	14,0	1475	41	12	22	0,08	
	47,6	15,4	1200	41	12	22	0,09	
	47,7	16,0	1200	43	12	22	0,09	
	47,0	14,7	1600	20-30	5	7	0,36	Bergmann et Gregorius, 1979
	47,0	14,7	850	20-30	5	7	0,44	
	47,7	14,7	700	20-30	5	7	0,42	
<i>Italie</i>	46,7	12,7	1350	150#	11	21	0,17	Giannini <i>et al.</i> , 1991
	46,7	12,0	1350	150#	11	21	0,17	
	46,3	11,5	1400	150#	11	21	0,16	
	46,3	11,5	-	20	11	21	0,16	
	46,3	11,2	1300	150#	11	21	0,16	
	46,5	11,0	-	150#	11	21	0,18	
	45,8	8,0	-	18	11	21	0,17	
	45,7	7,0	1400	33	11	21	0,17	
	44,2	10,5	1500	40	11	21	0,17	
<i>Hongrie</i>	47,7	16,4	425	41	12	22	0,09	Lagercrantz et Ryman, 1990
<i>Roumanie</i>	47,8	25,8	670	20-30	5	7	0,36	Bergmann et Gregorius, 1979
	47,7	25,5	860	20-30	5	7	0,40	
	47,5	25,8	750	20-30	5	7	0,39	
<i>Ex-Tchécoslovaquie</i>	48,7	14,7	850	37	12	22	0,09	Lagercrantz et Ryman, 1990
	48,8	19,0	830	40	6	8	0,31	Gömöry, 1992
	tarry		1400	40	6	8	0,28	
	chopok		1400	40	6	8	0,33	

Tableau 3 (suite)

	Lat	Long	Altitude	Nombre ind/pop	Nombre enz	Nombre loci	He	
<i>Ex-Tchécoslovaquie</i>	oravské beskydy		1500	40	6	8	0,33	Gömöry, 1992
	poľana		1400	40	6	8	0,35	
	vtačnik		1320	40	6	8	0,33	
	49,2	20,2	900	25	6	9	0,17	Muona <i>et al.</i> , 1990
	49,4	13,0	600	40	12	22	0,10	Lagercrantz et Ryman, 1990
	49,8	14,2	420	39	12	22	0,10	
	49,7	15,4	555	42	12	22	0,11	
	50,6	15,6	800	48	12	22	0,09	
	49,7	17,1	360	43	12	22	0,10	
	49,9	17,2	790	40	12	22	0,10	
49,6	18,3	600	40	12	22	0,09		
<i>Pologne</i>	49,9	19,2	600	41	12	22	0,10	
	49,4	20,8	700	43	12	22	0,10	
	50,5	16,4	750	41	12	22	0,10	
	51,5	16,5	87	47	12	22	0,09	
	52,3	17,1	65	43	12	22	0,11	
	53,5	16,4	125	42	12	22	0,09	
	53,9	15,9	125	43	12	22	0,09	
	53,3	15,8	175	41	12	22	0,09	
	54,2	17,0	140	39	12	22	0,09	
	54,5	17,3	65	39	12	22	0,10	
	52,7	23,8	130	44	12	22	0,12	
	53,3	23,3	175	43	12	22	0,10	
	53,3	22,9	150	44	12	22	0,12	
	54,2	22,6	175	43	12	22	0,11	
	54,3	22,8	200	42	12	22	0,12	
	49,1	19,8	1420	20-30	5	7	0,43	Bergmann et Gregorius, 1979
	49,3	18°5	600	20-30	5	7	0,38	
	50,1	16°5	580	20-30	5	7	0,41	
47	25	-	17	12	24	0,14	Lewandowski <i>et al.</i> , 1997	
52	18	-	54	12	24	0,13		
51	12	-	10	12	24	0,12		
<i>Ex-URSS</i>	48,3	24,3	1100	39	12	22	0,11	Lagercrantz et Ryman, 1990
	51,3	31,2	-	1000*	14	26	0,26	Krutovskii <i>et al.</i> , 1995
	53,8	30,3	175	42	12	22	0,12	Lagercrantz et Ryman, 1990
	55,1	30,2	150	52	12	22	0,12	
	55,8	31,2	-	1000*	14	26	0,25	Krutovskii <i>et al.</i> , 1995
	56,7	22,3	70	46	12	22	0,13	Lagercrantz et Ryman, 1990
	56,7	22,7	115	44	12	22	0,14	
	57,3	22,2	50	41	12	22	0,17	
	56,8	22,5	-	24	16	26	0,18	Goncharenko <i>et al.</i> , 1995
	56,8	24,7	-	24	16	26	0,17	
	56,7	27,3	-	24	16	26	0,20	
	57,9	24,7	-	24	16	26	0,18	
	57,3	25,2	-	24	16	26	0,19	
	57,8	27,0	90	40	12	22	0,13	Lagercrantz et Ryman, 1990
	58,1	27,4	30	41	12	22	0,13	
	56,5	32,0	200	39	12	22	0,12	
	58,0	33,2	100	45	12	22	0,13	
	57,8	36,5	200	41	12	22	0,12	

Tableau 3 (suite)

	Lat	Long	Altitude	Nombre ind/pop	Nombre enz	Nombre loci	He	Auteurs
<i>Ex-URSS</i>	54,5	37,7	-	1000*	14	26	0,25	Krutovskii <i>et al.</i> , 1995
	54,3	41,0	150	51	12	22	0,14	Lagercrantz et Ryman, 1990
	61,3	47,0	50	32	12	22	0,14	
	58,7	49,8	-	1000*	14	26	0,27	Krutovskii <i>et al.</i> , 1995
	58,0	53,0	200	39	12	22	0,15	Lagercrantz et Ryman, 1990
	55,0	58,0	300	28	12	22	0,17	
	58,0	65,3	100	33	12	22	0,14	
	58,2	68,8	100	38	12	22	0,15	
	60,5	29,7	75	44	12	22	0,16	
<i>Suède</i>	64,8	19,8	-	100*	14	26	0,28	Krutovskii <i>et al.</i> , 1995
	66,2	20,0	410	20-30	5	7	0,45	Bergmann et Gregorius, 1979
	61,3	15,8	250	20-30	5	7	0,44	
	59,9	15,8	120	20-30	5	7	0,45	
	64,2	16,0	270	37	12	22	0,13	Lagercrantz et Ryman, 1990
	63,0	16,7	270	37	12	22	0,13	
	62,5	15,2	350	34	12	22	0,12	
	59,9	15,4	149	39	12	22	0,13	
	59,9	15,3	149	37	12	22	0,13	
	59,8	15,6	140	42	12	22	0,13	
	59,6	15,5	90	41	12	22	0,13	
	59,5	13,4	75	39	12	22	0,13	
	59,1	12,5	165	40	12	22	0,13	
	59,2	17,9	50	37	12	22	0,15	
	57,8	13,8	240	41	12	22	0,12	
	57,4	14,4	250	36	12	22	0,13	
	57,6	14,2	240	37	12	22	0,14	
	57,2	13,3	170	47	12	22	0,14	
57,3	15,7	250	40	12	22	0,13		
56,3	14,8	175	34	12	22	0,12		
<i>Finlande</i>	66,2	28,7	300	22	6	9	0,23	Muona <i>et al.</i> , 1990
	68,7	26,7	280	20-30	5	7	0,42	Bergmann et Gregorius, 1979
	64,2	29,5	230	20-30	5	7	0,45	
	61,9	27,9	100	20-30	5	7	0,40	
							0,206	

* Ten bulked seed lots randomly collected from 100 or 1000 trees

150 endosperms for the bulk provenance collections

ont un niveau de diversité proche de 0,08 alors que Konnert (1991) obtient des valeurs aux environs de 0,25 et Krutovskii *et al.* (1995) de 0,19. En règle générale, Lagercrantz et Ryman (1990) obtiennent toujours des valeurs inférieures de moitié aux autres auteurs ($H_s = 0,115$), la valeur moyenne obtenue sur l'ensemble des études pour une population d'Epicéa s'élevant à 0,21. Ces différences importantes dépendent du nombre systèmes enzymatiques étudiés ainsi que de l'échantillonnage des populations analysées. Par exemple pour des populations allemandes représentées par les bourgeons de 30 à 40 individus, Lagercrantz et Ryman (1990) étudient 12 systèmes enzymatiques (22 loci) alors que Konnert (1991) en étudie 6 (8 loci). Krustovskii *et al.* (1995) analysent, 14 systèmes enzymatiques (26 loci) sur une dizaine de mélanges d'extraits protéiques de graines issues d'au moins 100 individus représentatifs de la population analysée.

Le niveau de diversité des populations d'Epicéa a été rarement estimé à partir d'autres types de marqueurs. Les seules données disponibles concernent deux populations françaises (Passerieux 1998) et une population italienne (Bucci et Menozzi 1995) étudiées par des marqueurs RAPD. Les valeurs obtenues sont très proches ($H_e = 0,26$ (Gérardmer), 0,27 (Chapois) et 0,33 (Campolino)) de celles issues des analyses d'isoenzymes réalisées sur des populations également situées dans la partie Ouest du domaine alpin (populations suisses, **Tableau 3**).

III. 2. 2. Structuration de la diversité génétique et relations génétiques entre populations

III. 2. 2. 1. Aire totale (Lagercrantz et Ryman 1990)

Les analyses des relations génétiques utilisant soit l'analyse UPGMA basée sur les distances génétiques de Nei (1987) soit l'analyse en composantes principales (ACP), révèlent deux groupes principaux : les populations d'Europe centrale (domaine hercyno-carpathique et alpin) et les populations baltico-nordiques (domaine baltico-nordique). Ce dernier groupe, plus hétérogène est lui-même formé de 3 sous-groupes: les populations de l'Ex-URSS, les populations suédoises et les populations du nord-est de la Pologne qui sont les plus proches génétiquement des populations d'Europe centrale.

Les populations du domaine baltico-nordique ont des indices de diversité supérieurs à celles de l'Europe centrale (domaines hercyno-carpathique et alpin). Pour expliquer ces différences, Lagercrantz et Ryman (1990) invoquent des événements relatifs à l'histoire glaciaire et postglaciaire de l'espèce. L'existence lors des périodes glaciaires de goulots d'étranglement situés en Europe centrale (effet "Bottleneck"), aurait conduit à la disparition des populations, entraînant ainsi une forte diminution de la diversité initiale.

Ces analyses révèlent aussi une bonne concordance entre les distances géographique, moléculaire et morphologique des populations étudiées. Pour expliquer cette concordance, Lagercrantz et Ryman (1990) émettent l'hypothèse que les populations actuelles ont conservé des

complexes de gènes contrôlant isozymes et caractères phénotypiques propres aux populations refuges de la fin du tertiaire : elle est appelée hypothèse d'empreinte de l'évolution.

III. 2. 2. 2. Les populations Italiennes (Giannini *et al.* 1991)

L'analyse a porté sur 9 populations autochtones, 8 situées le long de la chaîne alpine et une population relique située dans la réserve naturelle de Campolino dans les Apennins toscans. Toutes ces populations présentent des valeurs de diversité comparables (**Tableau 3**). Cependant, certains allèles (ACP-B) sont fortement représentés dans les populations du Nord-Ouest de l'Italie (Vallée d'Aoste) alors qu'ils sont rares ailleurs. Les auteurs soulignent également les particularités de la population de Campolino. En dépit de sa position marginale et de son complet isolement, le niveau d'hétérozygotie ainsi que le nombre d'allèles par locus y sont remarquablement élevés. On note de plus la présence d'allèles uniques (SKDH-A et MDH-B) et d'un allèle rare en forte proportion (GOT-B3). Toutes ces particularités justifient l'hypothèse de l'existence d'un refuge glaciaire supplémentaire situé dans les Apennins.

III. 2. 2. 3. Les populations suisses (Müller-Starck 1995)

L'étude a porté sur 20 populations situées sur un transect est-ouest traversant la Suisse. Les résultats montrent que les populations de haute altitude ont des niveaux de diversité similaires entre elles, et avec les populations de plus basses altitudes. Cependant, les 2 populations du Sud-Ouest possèdent un allèle au locus SKDH-A, dont la fréquence (>17%), est beaucoup plus forte que dans les autres populations analysées (<2,5%). Cette structuration géographique et à mettre en relation avec les hypothèses émises par Burga (1988) qui suggère, d'après les analyses polliniques, l'existence d'un chemin de ré-immigration sud-nord passant par le Simplon (Alpes du Valais) en plus du chemin principal qui traverse la Suisse d'est en ouest.

III. 2. 2. 4. Les populations allemandes de la Forêt Noire (Konnert 1990 et 1991)

Depuis longtemps (200 ans), la Forêt Noire a été largement reboisée par des provenances inconnues et les quelques populations autochtones restantes d'identification incertaines seraient plutôt localisées au Sud du massif. Les populations du Nord et du Sud se distinguent par la présence d'allèles rares aux locus 6PGD-B, IDH-A, G6PDH-A. Cependant ces différences ne suffisent pas pour mettre en évidence une structure géographique.

V. Présentation du travail de thèse

L'aire française de l'Epicéa est située en limite ouest de l'aire naturelle de l'espèce. Les limites d'aires contiennent souvent des pools de gènes intéressants puisqu'elles recèlent de populations diversifiées et adaptées à des conditions climatiques non représentatives du reste de l'aire (Mayr 1970). Par exemple, les populations d'Epicéa du sud des Alpes très bien adaptées à la sécheresse peuvent constituer un réservoir de ressources génétiques face aux bouleversements attendus sous l'effet du réchauffement climatique (Gravenhorst 1991, Peters 1990).

L'aire française appartient au domaine alpin (Wegmüller 1977 ; De Beaulieu 1977 ; Huntley et Birks 1983). Ce dernier serait issu d'un refuge glaciaire localisé au sud-est de l'Europe, dans les Alpes dinariques. Cependant, les données allozymiques récentes issues de l'analyse de populations adjacentes à l'aire française (Italie, Suisse, Allemagne) montrent que des doutes subsistent quant au caractère unique de ce refuge dinarique (De Beaulieu 1977 ; Burga 1988, Borghetti *et al.* 1988, Giannini *et al.* 1991, Müller-Starck 1995).

Le massif vosgien est situé à la pointe ouest de l'aire européenne de l'espèce. L'existence spontanée de l'Epicéa qui y a longtemps été contestée, demeure mystérieuse. D'où vient-elle? de la Forêt-Noire située à 75Km, du Jura français ou du Plateau Suisse situés à 120 km?

Dans ce contexte et pour améliorer les connaissances sur la structuration de la variation génétique de l'Epicéa, nous avons entrepris l'étude des variations moléculaires avec des marqueurs ADN, encore non utilisés chez cette espèce lorsque nous avons débuté ce travail. En l'absence de marqueur à hérédité maternelle, nous avons utilisé les marqueurs RAPD qui présentent l'avantage d'être neutres et non limités (chapitre 1).

Nous avons procédé en trois étapes. Dans la première nous avons cherché à décrire la structuration à l'échelle de l'espèce et à confronter les variations observées à celles obtenues à partir des caractères quantitatifs mesurés par ailleurs (chapitre 2). La structuration génétique étant ainsi établie à l'échelle européenne, nous nous sommes ensuite focalisés sur l'aire française en examinant la situation au sein des massifs alpin, jurassien et des Vosges (chapitre 3). Enfin, dans une dernière partie nous nous sommes intéressés au cas particulier des populations autochtones vosgiennes qui comme nous l'avons vu sont disséminées parmi de nombreuses plantations (chapitre 4).

Bibliographie

Badré L (1983). *Histoire de la forêt française*. Edition Arthaud, Paris.

Badré L (1992). Les forêts et les industries en Lorraine à la fin du XVIIIème siècle. *Rev For Fr* XLIV : 365-369

Beaulieu JL De (1977). Contribution pollenanalytique à l'histoire tardiglaciaire et holocène de la végétation des Alpes méridionales française. Thèse Université d'Aix- Marseille III

- Beaulieu JL De, Kostenzer J, Reich K (1993).** Dynamique forestière holocène dans la haute vallée de l'Arve (Haute Savoie) et migrations de *Abies* et *Picea* dans les Alpes occidentales. *Dissert Bot* 196 : 387-398
- Beaulieu JL De, Richard H, Ruffaldi P, Clerc J (1994).** History of vegetation, climate and human action in the French Alps and the Jura over the last 15,000 years. *Dissert Bot* 234 : 253-275
- Beaulieu JL De, Suc JP (1985).** Les pollens et l'histoire de la végétation. *Histoire et Archéologie* 93 : 67-73.
- Bennett KD (1985).** The spread of *Fagus grandifolia* across eastern North America during the last 18,000 years. *J Biogeogr* 12 : 147-164
- Bennett KD, Tzedakis PC, Willis KJ (1991).** Quaternary refugia of north European trees. *J Biogeogr* 18 : 103-115
- Berard A (1960).** Evolution des forêts vosgiennes. *Rev For Fr* 3 : 190-197
- Berard A (1988).** La forêt vosgienne. *Bull Soc For de Franche Comté et des provinces de l'Est* 29 : 197-210.
- Berger A (1992).** *Le climat de la terre*. Edition De Boeck Université, Bruxelles.
- Bergmann F, Gregorius HR (1979).** Comparison of the genetic diversities of various populations of Norway spruce (*Picea abies*). *Proceeding of a conference on biochemical genetics of forest trees*. Umeå Swedish University of Agricultural Sciences, pp 99-107
- Bocquet A (1987).** L'homme, la forêt, le bois il y a 5000 ans. *Rev For Fr* 39 : 457-464
- Borghetti M, Giannini R, Menozzi P (1988).** Geographic variation in cones of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genet* 37 : 178-184
- Bortenschlager I (1976).** Beiträge zur vegetationsgeschichte Tirols. II : kufstein-kitzbühel-Passthurn. *Ber Nat-Med Ver Innsbrück* 63 : 105-137
- Bourgenot L (1977).** Histoire forestière. *Rev For Fr* 29
- Bouvarel P (1954).** Variabilité de l'Epicéa (*Picea excelsa* Link.) dans le Jura français. Répartition et caractères des divers types. *Rev For Fr* 2 : 87-98
- Bouvarel P (1956).** Applications de la génétique forestière à l'Epicéa du Jura. *Bull Soc For de Franche comté et des provinces de l'Est*, décembre : 1-15
- Bouvarel P (1961).** Observation sur la date de l'aoûtement de quelques provenances françaises d'Epicéa. *Annales Nationale des Eaux et Forêt et de la Station de Recherche et Expérience* 18 : 99-129
- Bouvarel P (1974).** L'adaptation écologique des arbres forestiers. Applications à la sélection. Dans, *Ecologie Forestière. La forêt : son climat, son sol, ses arbres, sa faune* par Person P. Edition Gauthier-Villars, Paris-Bruxelles-Montréal.
- Bouvarel P et Jacamon M (1959).** Les Epicéas remarquables du Kertoff. *Bull Soc Bot Fr* 106 : 128-130
- Broecker WS, Van Donk J (1970).** Insolation changes, ice volumes and the O^{18} record in deep sea cores. *Review Geophysics and Space Physics* 8 : 169-198
- Bucci G, Menozzi P (1995).** Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst. population. *Heredity* 75 : 188-197
- Buc'Hoz P (1763).** *Tournefortius Lotharingiae ou Catalogue des plantes qui croissent en Lorraine et les trois évéchés*, Nancy.

- Burga CA (1988).** Swiss vegetation history during the last 18 000 years. *New Phytol* 110 : 581-602
- Campbell JJN (1982).** Pears and persimmons : a comparison of temperate forests in Europe and eastern North America. *Vegetatio* 49 : 85-101
- Conférence ministérielle pour la protection des forêts en Europe,** décembre 1990, Strasbourg.
- Dansgaard W, Johnsen SJ, Clausen HB, Dahl-Jensen D, Gundestrup N, Hammer CU, Oeschger H (1984).** North atlantic climatic oscillations revealed by deep Greenland ice cores. Dans, *Climate processes and climate sensitivity* pp 288-298. Edité par Hansen JE, Takahashi. American Geophysical Union, Washington.
- Davis MB (1983).** Quaternary history of deciduous forests of eastern north America and Europe. *Ann Mo Bot Gard* 70 : 550-563
- Debazac EF (1977).** *Manuel des conifères*. Edition ENGREF, Nancy.
- Denton GH, Hughes TJ (1981).** *The least great ice sheets*. Edité par Wiley J and Sons, New York.
- Dubois G (1947).** L'analyse pollinique et l'histoire des forêts françaises depuis 10 000 ans. *Bull Soc For de Franche Comté* 26 : 100-115
- Dubois G, Dubois C (1940).** Etude pollen-analytique de tourbières de la région de Chamonix. *Rev Sci Nat Auvergne* 6 : 53-80
- Dubois G, Dubois C (1945).** *CR Acad Sci* 221 : 634-636
- Elhaï (1968).** *Biogéographie*. A. Colin, Paris.
- Ferrarini E (1977).** Cenosi a *Picea abies* (L.) Karst. Relitte sull'Appennino. *Ann Acc Ital Sci For* 26 : 185-237
- Fink J, Kukla GJ (1977).** Pleistocene climates in Central Europe: at least 17 interstadials after the Olduvai event. *Quaternary Res* 7 : 363-372
- Firbas F, Grunig G, Weischedel I, Worzel G (1948).** Beiträge zur spät- und nacheiszeitlichen Vegetationgeschichte der Vogesen. *Bibl Bot* 121 : 1-76
- Firtion F (1950).** Contribution à l'étude paléontologique, stratigraphique et physico-chimique des tourbières du Jura français. *Mém Serv Carte Géol Alsace et Lorraine* 10, 92p
- Fliche P (1875).** Note sur les lignites du quaternaire de Jarville près de Nancy, *CR Acad Sci CLXXX*
- Fliche P (1883).** Note sur les lignites du quaternaire du Bois l'Abbe près d'Epinal. *CR Acad Sci*
- Fliche P (1908).** L'indigénat de l'Epicéa (*Picea excelsa*) dans les Hautes Vosges. *Bulletin de l'Herbier Boissier* 8 : 718-722
- Fourchy P (1966).** Déboisement et reboisement. Les débuts de la lutte contre l'érosion au XIXème siècle dans les Alpes françaises. *Rev For Fr* 18 : 467-487
- Giannini R, Morgante M, Vendramin GG (1991).** Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genet* 40 : 160-166
- Godron A (1843).** *Flore de Lorraine* (Meurthe, Moselle, Meuse et Vosges), tome 2. Nancy.
- Gömöry D (1992).** Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *For Ecol Manag* 54 : 215-223

- Goncharenko GG, Zadeika IV, Birgelis JJ (1995).** Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in natural populations of Latvia. For Ecol Manag 72 : 31-38.
- Gravenhorst G (1991).** Genetic variation in forest tree populations: the view point of bioclimatologist on genetic variation of forest trees pp 2-19. Dans, *Genetic variation in European population of forest trees*. Edité par Müller-Starck F, Ziehe M. Suaerlander's Verlag, Frankfurt am Main.
- Greslier N, Renaud JP, Chauvin C (1995).** Les forêts subnaturelles de l'arc alpin français. Reflexion méthodologique pour un recensement et une typologie des principales forêts alpines peu transformées par l'homme. Rev For Fr XLVII : 241-254
- Guinier P (1901).** L'Epicéa est-il spontané dans les Vosges. Revue des Eaux et Forêts Ser. 3-T. 40 : 697
- Guinier P (1959).** Trois conifères de la flore vosgienne. Bull Soc Bot Fr 106 : 168-183
- Guyot C (1886).** *Les forêts Lorraines jusqu'en 1789*, Nancy.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992).** Factor influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New For 6 : 95-124
- Hartman FK (1974).** Mitteleuropäischen Wälder. Bildband. Edité par Fischer, Stuttgart.
- Hatt P (1937).** Contribution à l'analyse pollinique des tourbières du Nord-Est de la France. Thèse Université de Strasbourg.
- Heeb K, Welten M (1972).** Moore und Vegetationsgeschichte der Scharzeneck und des Molassevorlandes zwischen dem Aaretal unterhalb Thun und dem oberen Emmental. Mitt Naturf Ges Bern 29 : 1-54
- Heitz C (1975).** Vegetationsentwicklung und Waldrenschwankungen des Spät- und Postglaziales im Oberhabstein (Gräubingen, Schweiz) mit besonderer Berücksichtigung der Fichteneinwanderung. Beitr zur geobotanischen landesaufnahme der Schweiz 55 : 63p
- Huntley B (1988).** *Glacial and holocene vegetation history in Europe*. Dans, *Vegetation history* pp 341-383. Handbook of vegetation science vol 7. Edité par Huntley B, Webb III T. Kluwer, Dordrecht.
- Huntley B (1990).** European post-glacial forests: compositional changes in response to climatic change. J Veg Sci 1 : 507-518
- Huntley B, Birks HJB (1983).** *An atlas of past and present pollen for Europe 0-13,000 years ago*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Issler E (1953).** L'histoire de la forêt Haut-Rhénoise dans ses support avec les climats au cours du quaternaire. Bull Soc Hist Nat Colmar XLIV : 4-11
- Jacamon M (1987).** *Guide de dendrologie. Arbres, arbustes et arbrisseaux des forêts françaises. Tome 1 : les conifères*. Edition ENGREF, Nancy.
- Kalis AJ (1984).** L'indigénat de l'Epicéa dans les Hautes Vosges. Rev Paléobiol vol sp Avril : 103-115
- Kärki L (1980).** Genetically narrow-crowned and fine-branched trees are valuable in forestry. The foundation for Forest Tree Breeding in Finland.
- Kienast F (1999).** Scenarios d'évolution des aires de répartition des principales essences forestières en fonction des scénarios de changement climatique. Journées Scientifiques et Techniques, Champenoux.
- Kirschleger F (1836).** *Podrome de la flore d'Alsace*, Strasbourg.

- Konnert M (1990).** Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald: Genetische differenzierung von beständen. Allg Forst-u J-Ztg 162 : 100-106
- Konnert M (1991).** Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald: Genetische Variation und Korrelationen. Fortwissenschaftliches Centrablatt 110 : 84-94
- Kral F (1979).** Spät- und Postglaziale Waldgeschichte der Alpen auf Grund der bisherigen Pollenanalysen. Ed Oster Agrarverlag, Wien.
- Krutovskii KV, Bergmann F (1995).** Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. Heredity 74 : 464-480.
- Krutzsch P (1992).** IUFRO's role in coniferous tree improvement: Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). Silvae Genet 41 : 143-150
- Kullman L. (1996).** Recent tree-limit history of *Picea abies* in the southern Swedish Scandes. Can J For Res 16 : 761-771.
- Lacaze JF (1969).** Etude de la variabilité infraspécifique de l'Epicéa (*Picea abies* Karst.). Provenances françaises et polonaises. Résultats au stade juvénile. Ann Sci For 26 : 345-396
- Lacaze JF (1970).** Analyse d'une expérience multi-stationnelle de provenances d'Epicéa (*Picea abies* Karst.). Ann Sci For 27 : 5-37
- Lagercrantz U, Ryman N (1990).** Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. Evolution 44 : 38-53
- Lanier L (1994).** *Précis de sylviculture*. Edition ENGREF, Nancy.
- Lehner A, Campbell MA, Wheeler NC, Pöykkö T, Glössl J, Kreike J, Neale DB (1995).** Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. F. *pendula*). Theor Appl Genet 91 : 1092-1094
- Lemée G (1955).** L'évolution de la forêt française au cours du quaternaire d'après les analyses polliniques. Rev For Fr 6 : 442
- Lewandowski A, Burczyk J, Chalupka W (1997).** Preliminary results on allozyme diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Poland based on plus tree investigations. Act Soc Bot Pol 66: 197-200
- Lorentz (1825).** Cours de sylviculture, ENGREF, Nancy.
- Marcus Mappus (1742).** Historia plantarum alsaticarum, Ed Hermann.
- Markgraf V (1970).** Paleohistory of the spruce in Switzerland. Nature 228 : 249-251
- Mathieu A (1858).** *Flore forestière, description et histoire des végétaux ligneux qui croissent spontanément en France*. Edition Grimblot, Nancy.
- Mayr E (1970).** Populations, species and evolution. Harvard University Press, Cambridge.
- Mer E (1917).** Association de l'Epicéa au Sapin dans les sapinières des Hautes Vosges. Rev Eaux et Forêts Ser. 5-T. 55 : 262-270.
- Meyer L (1912).** Les Vosges méridionales à l'époque glaciaire. Bull Soc Hist Nat Colmar tome XI.
- Mougeot JB (1845).** Considérations générales sur la végétation spontanée des Vosges. Dans, *le département des Vosges. Statistique historique et administrative*. Edité par Lepage H, Charton C, Epinal.

- Müller-Starck G, Baradat P, Bergmann F (1992).** Genetic variation within European tree species. *New For.* 6 : 23-47
- Müller-Starck G (1995).** Genetic variation in high-elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Switzerland. *Silvae Genet* 44 : 356-362
- Muona O, Paul L, Szmidt AE, Kärkkäinen K (1990).** Mating system analysis in a central and northern European population of *Picea abies*. *Scand J For Res* 5 : 97-102
- Nei M (1987).** *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Oberdorfer E (1937).** Zur spät- und nacheiszeitlichen Vegetationgeschichte des Oberelsasses und der Vogesen. *Z Bot* 30 : 513-572
- Oberdorfer E (1957).** Süddeutsche Pflanzengesellschaften. Dans, *Pflanzensoziologie*, band 10. Ed. Fischer, Jena.
- Oberdorfer E (1979).** *Pflanzensoziologische Exkursionsflora*. Ed. Ulmer, Stuttgart.
- Ozenda P (1994).** *Végétation du continent européen*. Edition Delachaux et Niestlé, Lausanne.
- Passerieux E (1998).** Evaluation de la diversité génétique des sous-populations embryogènes issues de deux lots de semences de *Picea abies* (L.) Karst. Thèse Université Bourgogne.
- Perrin H (1964).** *Sylviculture, tome 2 : Le traitement des forêts, théorie et pratique des techniques sylvicoles*. Edition ENGREF, Nancy.
- Peters RL (1990).** Effects of global warming on forests. *For Ecol Manag* 35 : 13-33
- Peterson GM, Webb III T, Kutzbach JE, Van der Hammen T, Wijmstra TA, Strat FA (1979).** The continental record of environmental conditions at 18,000 year BP: an initial investigation. *Quaternary Res* 12 : 47-82
- Pöykkö VT, Pulkkinen PO (1990).** Characteristics of normal-crowned and pendula spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) examined with reference to the definition of a crop tree ideotype. *Tree Physiol* 7 : 201-207
- Rameau JC, Mansion D, Dumé G (1993).** *Flore forestière française, tome 2 : montagnes*. Edition IDF, Paris.
- Reille M (1991).** L'origine de la station des pins à crochets de la tourbière de Pinet (Aude) et de quelques stations isolées de cet arbre dans les Vosges et le Jura. *Lettres Bull Soc Bot Fr* 138 : 123-148
- Richard H (1983).** Nouvelle contribution à l'histoire de la végétation franc-comtoise tardiglaciaire et holocène à partir des données de la palynologie. Thèse Besançon, 155p.
- Riou-Nivert P (1996).** *Les résineux. Tome 1 : connaissances et reconnaissance*. Edition IDF, Paris.
- Ruffieux S (1996).** Structuration de la variabilité génétique de l'Epicéa commun. Rapport de stage ESITPA, Orléans.
- Schmidt-Vogt H (1978).** Monographie der *Picea abies* (L.) Karst. Unter Berücksichtigung genetischer und züchterischer Aspekte. *Forst-Wissenschaftliches Centralblatt* 97 : 281-302
- Schmidt-Vogt H (1986).** *Die Fichte*, Band II/1. Edition Parey, Berlin.
- Seret G, Dricot E, Wansard G (1990).** Evidence for an early glacial maximum in the French Vosges during the last glacial cycle. *Nature* 346 : 453-456.
- Skinner BJ, Porter SC (1987).** *Physical geology*. Wiley J and Sons, New York.
- Tallantire (1973).** Apropos the postglacial spread of spruce in Switzerland. *Grana* 13 : 79-94

- Thiercelin F (1970).** Tardiveté du debourrement et densité du bois dans une population adulte de *Picea abies* Karst. Ann Sci For 27 : 243-254
- Tondon J (1992).** Inventaire des pessières naturelles (*Picea abies*) du massif vosgien. Mastère Sciences Forestière ENGREF.
- Vedel H, Lange J, Luzu G (1968).** Arbres et arbustes de nos forêts et de nos jardins. Edition Fernand Nathan, Paris.
- Vetvicka V, Matousova V (1991).** *Arbres et arbustes*. Edition Gründ, Paris.
- Walter E (1926).** Modifications survenues dans la flore d'Alsace et de Lorraine depuis 1970. Bull Soc Bot Fr LXXIII
- Wegmüller S. (1966).** Ueber die pät- und postglaciale végétationsgeschichte des südwestlichen Jura. Beiträge zur Geobotanischen Landesaufnahme der Schweiz, 548: 1-144.
- Wegmüller S. (1977).** Pollenanalytische Untersuchungen zur Spät- und postglazialen Vegetationsgeschichte der französischen Alpen (Dauphiné). Haupt, Bern.
- West RG (1970).** Pleistocene history of the British flora. In, Studies in the vegetational history of the British Isles. Ed. Walkers D et West RG. Cambridge University Press, Cambridge.
- West RG (1980).** Peistocene forest history of East Anglia. New Phytol 85 : 571-622
- Woillard GM (1978).** Grande Pile peat bog: a continuous pollen record for the least 140,000 years. Quaternary Res 9 : 1-21
- Wolfe JA (1978).** A paleobotanical interpretation of tertiary climates in the Northern Hemisphere. American Scientist 66 : 694-703
- Zoller H (1956).** Die Höhenstufen, Wälder, Trockenrasen, Hochweiden und Moore der Vogezen. Bull Schweiz Bot Ges 66 : 342-354

Chapitre I : Recherche de marqueurs polymorphes et méthodes statistiques utilisées

I. La recherche de marqueurs polymorphes

I. 1. La méthode RAPD : son principe et ses limites

Parmi les différentes techniques d'analyse permettant d'étudier le polymorphisme de l'ADN, nous avons choisi la technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pour sa simplicité d'utilisation, la faible quantité d'ADN nécessaire et le nombre important de marqueurs qu'elle peut générer (Williams *et al.* 1990 ; Hadrys *et al.* 1992)

Cette technique consiste à amplifier, au hasard dans le génome, des régions codantes et/ou non codantes délimitées à chaque extrémité par des sites de fixation inversés d'un oligonucléotide de séquence connue mais aléatoire.

En raison de la faible taille des oligonucléotides utilisés (8 à 15 pb), la probabilité de trouver deux sites de fixation en orientation inversée sur les deux brins d'ADN complémentaires à une distance convenable pour que la région entre ces deux sites soit amplifiée (c'est-à-dire entre 500 et 2500 pb) est élevée (**Figure 10**). Un calcul simple⁴ indique que chez l'Epicéa qui possède un génome de grande taille (29,6 pg/2C, Dhillon 1987), 24,3 fragments sont théoriquement amplifiables pour une amorce de 10 pb. L'origine du polymorphisme des fragments amplifiés au sein d'une population provient de modifications localisées soit au niveau des sites de fixation des amorces soit entre ces sites (**Figure 11**).

⁴ Calcul du nombre de fragments amplifiables :

Quantité d'ADN/ Noyau 2C = 29,6 pg = $29,6 \cdot 10^{-12}$ g (Dhillon 1987)

Nombre de pb / Noyau C d'ADN = $[(14,8 \cdot 10^{-12} / 330) \cdot 6,02 \cdot 10^{23}] / 2 = 1,33 \cdot 10^{10}$ pb

Nombre de sites possibles de fixation d'une amorce de 10 pb : $Nt = (1/4^{10}) \cdot 1,33 \cdot 10^{10} = 12779$

Nombre de sites possibles d'amplification (c'est-à-dire distant d'au moins 500 pb et d'au plus 2500 pb) :

$Na = 12779 \cdot (2500 - 500) \cdot (1/4^{10}) = 24,3$

Avec, Constante d'Avogadro $N = 6,02 \cdot 10^{23}$; Masse Molaire d'une base = $330 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

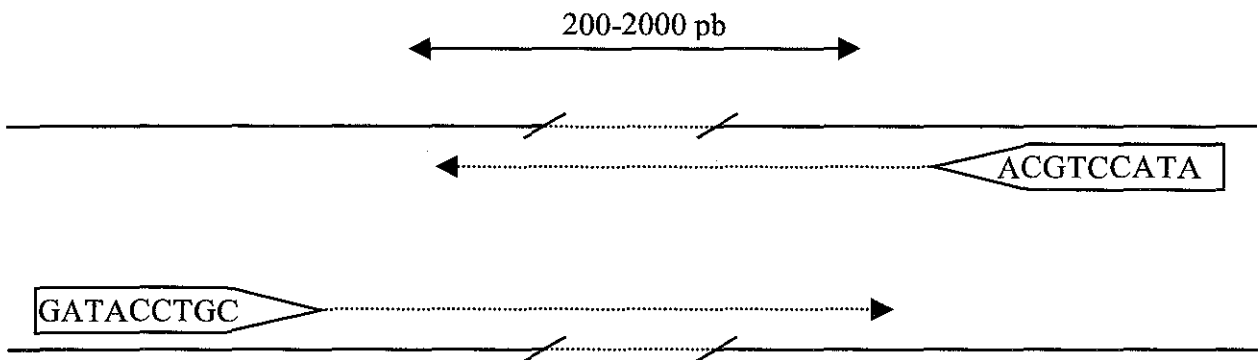


Figure 10 : Fixation d'un oligonucléotide en orientation inversée permettant l'amplification d'un fragment RAPD

L'utilisation de fragments RAPD a cependant quelques limites importantes. Les premières sont d'ordre technique. Utilisant les techniques d'amplification enzymatique de l'ADN (PCR, Polymerase Chain Reaction), la méthode RAPD est particulièrement sensible aux conditions de réaction et de très légers changements peuvent affecter la reproductibilité des profils d'amplification obtenus. Elle nécessite donc une très grande standardisation, tant au niveau de la quantité d'ADN et des produits utilisés (*Taq* polymérase, dNTP, eau UP...) qu'au niveau des conditions de manipulation. Il en résulte des situations très contrastées : variation considérable (Penner *et al.* 1993), ou au contraire très bonne similitude des profils obtenus dans différents laboratoires (Skov 1998). Au sein d'un même laboratoire cependant on observe généralement une bonne reproductibilité (Hadrys *et al.* 1992 ; Skov 1998 ; Passerieux 1998).

A ces contraintes techniques s'ajoute une certaine incertitude dans la lecture des profils d'amplification. L'obtention de deux fragments de même taille ne signifie pas nécessairement qu'ils sont homologues. Les essais réalisés par différents auteurs (Hadrys *et al.* 1992 ; Wilkie *et al.* 1993 ; Bodénès *et al.* 1997) ont cependant montré que c'est le plus souvent le cas, même si les exceptions ne sont pas rares (Williams *et al.* 1993).

Enfin, dernière difficulté, en raison de la dominance des fragments RAPD, il n'est pas possible de calculer directement les fréquences alléliques à partir des fréquences présence/absence des fragments. Cependant, lorsque des informations préalables sur la structure génétique des populations sont disponibles (mode de reproduction), il est possible de transformer les fréquences présence/absence des fragments en fréquences alléliques (Lynch et Milligan 1994).

I. 2. Optimisation des conditions d'amplification chez *Picea abies*

I. 2. 1. ADN génomique

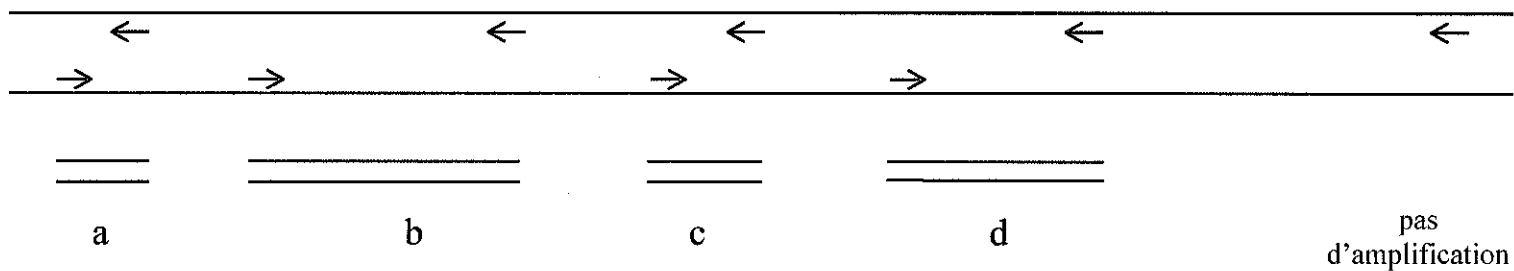
L'ADN total a été extrait à partir d'1 gramme d'aiguilles matures d'arbres adultes. Le rendement obtenu est en moyenne de 200 µg d'ADN.

Le protocole suivi a été adapté de Doyle et Doyle (1987) avec quelques modifications nécessaires à l'extraction de l'ADN de conifère. En effet la présence abondante de polysaccharides, de composés phénoliques (lignines...), terpènes, résines et autres métabolites secondaires dans les aiguilles peut perturber considérablement les réactions enzymatiques, notamment lors de l'amplification par PCR (Loomis 1974).

Nous avons donc ajouté dans le tampon d'extraction du 2-β-mercaptoéthanol (anti-oxydant), du polyvinylpyrrolidone (PVP-40 000, anti-oxydant, adsorbant les composés phénoliques) et du CTAB (Cetyltriméthylammonium bromide, détergent puissant). Nous avons procédé en outre, à un lavage à l'alcool à 70% avant la redissolution du culot d'ADN dans le tampon TE 0,1X (voir protocole complet en **annexe**).

En raison de la présence éventuelle de résidus phénoliques susceptibles de biaiser les mesures spectrophotométriques, la pureté et la quantité de l'ADN ont été estimés par visualisation sur gel

Genome A



Genome B

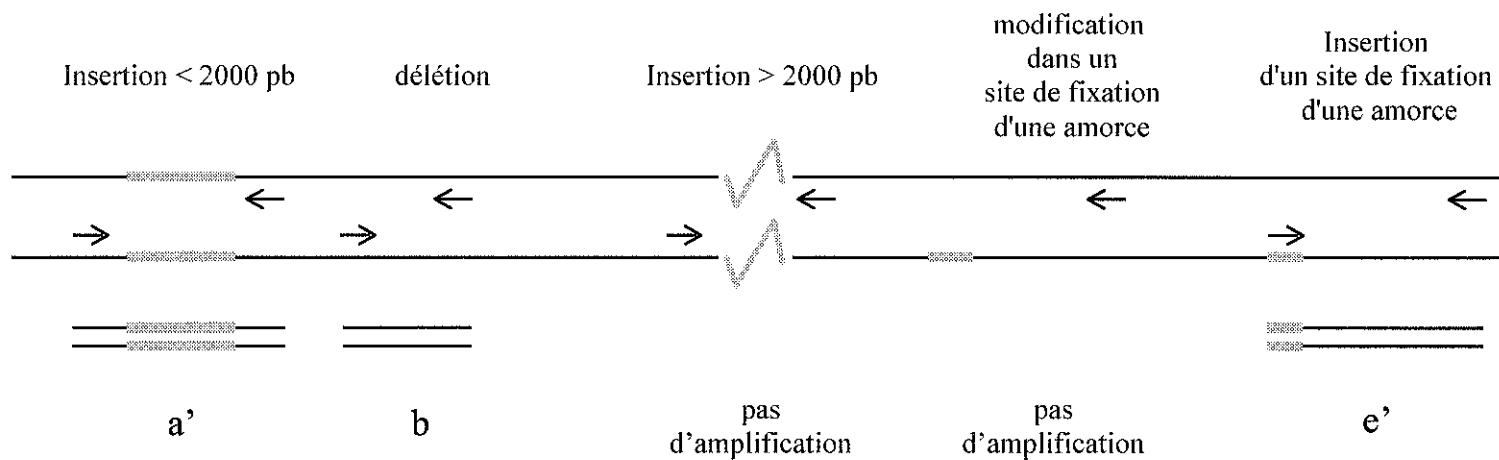


Figure 11 : Origine du polymorphisme des fragments

d'agarose à 0,7%. Chaque extrait a été ensuite ajusté à une concentration finale de 2,5 ng/μl. Pour plus de sécurité, les concentrations ainsi ajustées ont été vérifiées une seconde fois, toujours sur gel d'agarose, et les nouveaux ajustements nécessaires effectués jusqu'à ce que les concentrations de tous les extraits soient rigoureusement comparables. Cette homogénéité des concentrations de l'ADN est une condition essentielle pour une bonne reproductibilité des profils d'amplifications.

I. 2. 2. Sélection des amorces

197 amorces de 10pb provenant de deux fournisseurs différents (101 amorces Operon⁵ : OPA01 à OPE20 et OPH10, et 96 amorces Genosys⁶ : Deca0484 à Deca0579) ont été dans un premier temps testées sur l'ADN de 8 individus géographiquement très éloignés, selon le protocole d'amplification² décrit par Williams *et al.* (1990). Sur ces 197 amorces, 70 n'ont pu être amplifiées, et 47 ont généré des profils monomorphes. Les 80 amorces restantes ont été alors testées sur un échantillon plus large constitué de 24 ADN incluant les 8 précédents. L'analyse des profils obtenus a permis finalement de sélectionner 36 amorces sur la base de l'intensité de l'amplification, de la netteté du polymorphisme et de l'exacte reproductibilité des profils (au moins 5 répétitions). Chacune de ces 36 amorces a ensuite été testée à des concentrations différentes (0,2 mM à 2 mM) en présence de différentes concentrations en magnésium (1 à 6 mM). La concentration optimale en amorce s'est avérée très variable selon l'oligonucléotide utilisé (de 0,4 mM à 3 mM, **Tableau 4**). Par contre, la concentration optimale en magnésium est de 3 mM pour les 36 oligonucléotides sélectionnés.

I. 2. 3. Les fragments polymorphes retenus

Dans les profils générés par les 36 amorces sélectionnées, 170 fragments polymorphes (moyenne de 4,6 fragments par amorce) sont lisibles dans quasiment toutes les populations étudiées

(**Figure 12**). Pour chacun des ADN amplifiés, ces fragments ont été codifiés par 1 (présence) et 0 (absence) après 3 à 4 relectures confirmées par un deuxième observateur.

Les données ont été ensuite rassemblées dans une matrice de 170 colonnes (fragments) et 431 lignes (individus) contenant 65262 caractères de type 1/0. Les fréquences des 170 fragments dans chacune des populations étudiées sont données dans le **Tableau 5**.

⁵ Operon Technologie, (Alameda, USA)

⁶ Genosys Biotechnologies (Cambridge, UK)

Tableau 4 : Concentration utilisée pour chacune des 36 amorces de 10 pb retenues dans le volume réactionnel final

Amorces	5' → 3'	[Cf] μM	Amorces	5' → 3'	[Cf] μM
OPA02	TGCCGAGCTG	0,4	DECA0484	ACGCCGCAAT	0,6
OPA05	AGGGGTCTTG	0,4	DECA0494	AGAACGCACC	0,4
OPA10	GTGATCGCAG	0,4	DECA0502	AGCCGCTATC	0,4
OPA11	CAATCGCCGT	0,4	DECA0509	AGGAGTAGGC	0,4
OPA13	CAGCACCCAC	0,4	DECA0512	AGGTGGGCTT	0,4
OPB04	GGACTGGAGT	0,4	DECA0514	AGTCACCGCT	0,4
OPB06	TGCTCTGCCC	0,4	DECA0519	ATCAACCGGC	1
OPB08	GTCCACACGG	0,4	DECA0521	ATCCGGACCT	0,6
OPB14	TCCGCTCTGG	0,6	DECA0522	ATCGCCCTGT	0,4
OPC02	GTGAGGCGTC	0,4	DECA0527	ATGATCCCGC	0,4
OPC05	GATGACCGCC	0,4	DECA0549	CACTCGTCGT	1
OPC06	GAACGGACTC	0,4	DECA0550	CAGAAACCGC	0,4
OPC11	AAAGCTGCGG	0,4	DECA0561	CATACGGCCT	0,4
OPC15	GACGGATCAG	0,4	DECA0569	CCACGAATGC	0,4
OPD01	ACCGCGAAGG	0,4	DECA0573	CCAGCCGAAT	0,4
OPD03	GTCGCCGTCA	0,4			
OPD05	TGAGCGGACA	0,4			
OPD12	CACCGTATCC	0,6			
OPD20	ACCCGGTCAC	0,6			
OPE10	CACCAGGTGA	1			
OPH10	CCTACGTCAG	3			

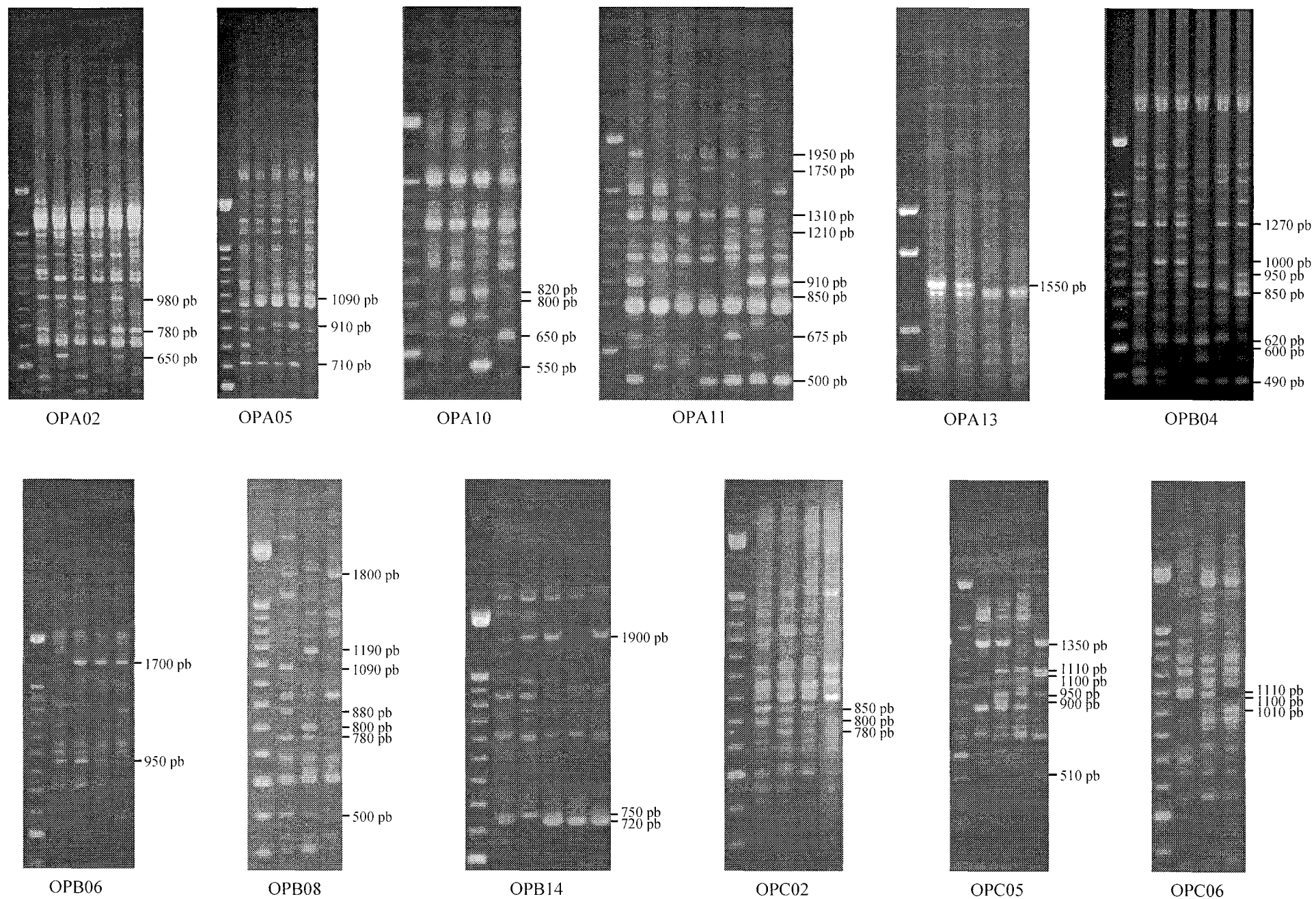


Figure 12 : Fragments polymorphes selectionnés parmi les profils générés par 36 amorces

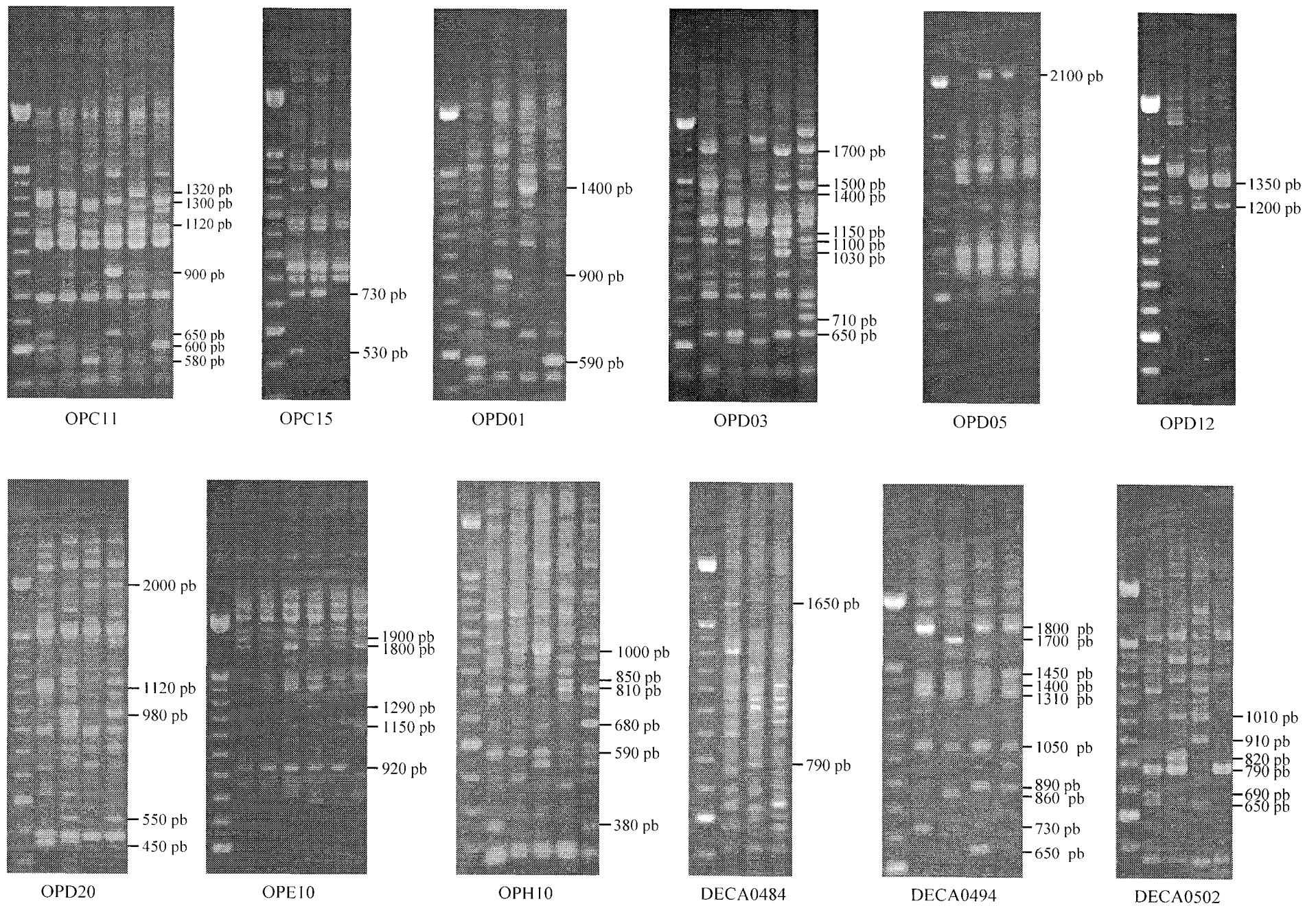


Figure 12 (suite) : Fragments polymorphes sélectionnés parmi les profils générés par 36 amorces

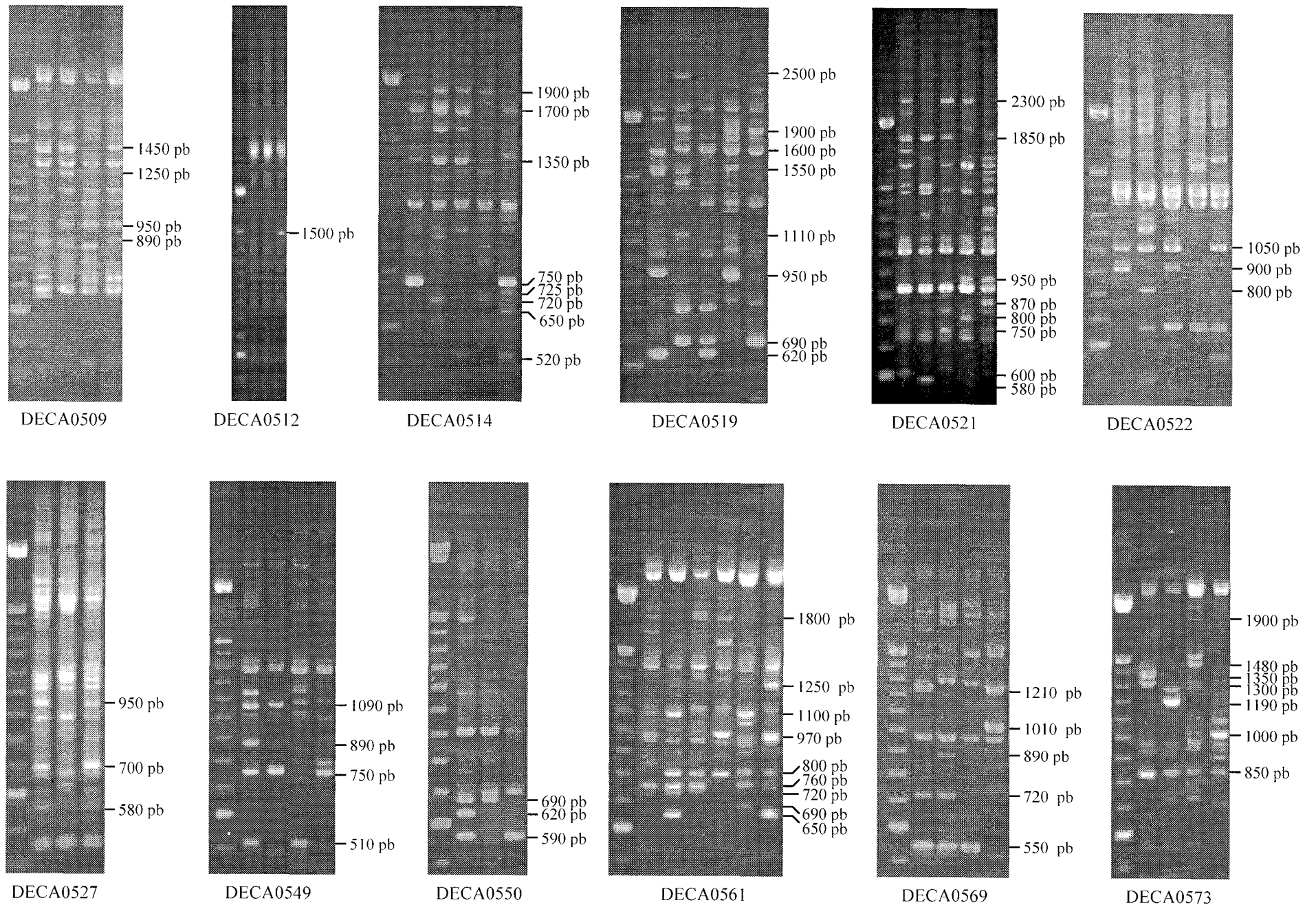


Figure 12 (suite) : Fragments polymorphes selectionnés parmi les profils générés par 36 amorces

Tableau 5 : Fréquences des 170 fragments RAPD dans tous les groupes et les populations étudiés

	DBN (31)	DHC (33)	DA (29)	VOSGES (30)	ALPES (30)	JURA (30)	CHFR (30)	KERT (34)	STRA (30)	GRVO (30)	BORE (31)	SFOY (30)	SLAU (31)	RACH (32)
OPA02-650	0,40	0,19	0,09	0,30	0,37	0,33	0,43	0,41	0,10	0,30	-	-	-	-
OPA02-780	0,23	0,26	0,31	0,47	0,23	0,37	0,20	0,35	0,17	0,29	-	-	-	-
OPA02-980	0,00	0,03	0,16	0,23	0,30	0,10	0,23	0,26	0,23	0,17	-	-	-	-
OPA05-710	-	-	-	-	-	-	0,67	0,88	0,70	0,87	1,00	0,93	0,71	0,66
OPA05-910	-	-	-	-	-	-	0,73	0,74	0,73	0,73	0,61	0,80	0,74	0,63
OPA05-1090	-	0,57	0,79	0,73	0,79	0,93	0,77	0,76	0,93	0,67	0,94	0,93	0,87	0,53
OPA10-550	0,53	0,29	0,38	0,33	0,10	0,07	0,27	0,12	0,10	0,10	0,03	0,30	0,19	0,28
OPA10-650	0,57	0,26	0,19	0,40	0,47	0,33	0,30	0,47	0,17	0,40	0,03	0,00	0,10	0,03
OPA10-800	0,83	0,58	0,78	0,77	0,70	0,63	0,57	0,44	0,47	0,57	0,97	0,90	0,68	0,25
OPA10-820	0,67	0,77	0,78	0,73	0,73	0,73	0,60	0,68	0,63	0,70	0,48	0,90	0,65	0,56
OPA11-500	0,45	0,90	0,68	0,87	0,93	0,83	0,83	0,88	0,93	0,77	0,84	0,97	0,87	0,25
OPA11-675	0,71	0,20	0,35	0,23	0,17	0,33	0,93	0,29	0,33	0,13	0,00	0,00	0,00	0,34
OPA11-850	0,07	0,13	0,03	0,17	0,30	0,07	0,23	0,32	0,30	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
OPA11-910	0,10	0,23	0,42	0,10	0,40	0,37	0,13	0,41	0,13	0,20	1,00	0,10	0,26	0,13
OPA11-1210	-	-	-	0,53	0,67	0,43	0,48	0,57	0,59	0,86	-	-	-	-
OPA11-1310	0,96	0,80	0,94	0,93	1,00	0,80	0,80	0,97	0,87	0,90	0,68	0,90	0,90	0,84
OPA11-1750	0,46	0,37	0,32	0,17	0,40	0,07	0,17	0,07	0,32	0,18	0,13	0,00	0,20	-
OPA11-1950	0,07	0,00	0,20	0,20	0,07	0,47	0,27	0,21	0,1	0,24	0,00	0,00	0,00	-
OPA13-1550	0,1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-
OPB04-490	0,00	0,03	0,00	0,24	0,07	0,10	0,17	0,26	0,13	0,23	0,32	0,20	0,19	0,38
OPB04-600	0,25	0,10	0,13	0,10	0,72	0,67	0,27	0,03	0,00	0,27	0,39	0,30	0,26	0,13
OPB04-620	-	-	-	-	-	-	0,80	0,71	0,80	0,83	0,71	0,60	0,71	0,88
OPB04-850	0,10	0,27	0,06	0,21	0,24	0,24	0,23	0,32	0,30	0,10	0,32	0,07	0,16	0,16
OPB04-950	0,03	0,17	0,16	0,52	0,34	0,41	0,60	0,68	0,23	0,40	0,26	0,30	0,16	0,31
OPB04-1000	0,83	0,93	0,78	0,59	0,79	0,72	0,73	0,79	0,8	0,8	-	-	-	0,97
OPB04-1270	0,70	0,77	0,94	0,97	1,00	0,83	1,00	0,47	0,6	0,7	-	-	-	0,77
OPB06-950	0,86	0,71	0,72	0,73	0,83	0,77	0,77	0,82	0,67	0,87	-	-	-	0,97
OPB06-1700	0,07	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	-	1,00
OPB08-500	0,30	0,61	0,29	0,73	0,60	0,39	0,60	0,41	0,33	0,53	0,23	0,40	0,35	0,44
OPB08-780	0,63	0,84	0,87	1,00	0,96	1,00	0,93	1,00	0,97	0,93	0,97	0,87	0,97	1,00
OPB08-800	0,00	0,16	0,09	0,00	0,00	0,07	0,00	0,06	0,03	0,07	0,00	0,03	0,13	0,09
OPB08-880	0,20	0,23	0,13	0,10	0,13	0,18	0,27	0,06	0,10	0,10	0,06	0,10	0,23	0,31
OPB08-1090	0,30	0,06	0,32	0,00	0,17	0,07	0,13	0,18	0,33	0,03	0,52	0,40	0,29	0,25
OPB08-1190	0,53	0,58	0,68	0,73	0,83	0,63	0,63	0,82	0,70	0,60	0,71	0,90	0,94	0,72
OPB08-1800	0,40	0,58	0,65	0,87	0,73	0,61	0,70	0,74	0,90	0,77	0,52	0,73	0,84	0,59
OPB14-720	0,17	0,13	0,26	0,17	0,45	0,24	0,13	0,32	0,03	0,27	0,71	0,20	0,19	0,09
OPB14-750	0,52	0,70	0,42	0,47	0,34	0,34	0,53	0,44	0,63	0,47	0,74	0,13	0,26	0,50
OPB14-1900	0,24	0,19	0,26	0,37	0,50	0,28	0,23	0,12	0,43	0,20	0,58	0,13	0,23	0,00

Tableau 5 (suite)

	DBN (31)	DHC (33)	DA (29)	VOSGES (30)	ALPES (30)	JURA (30)	CHFR (30)	KERT (34)	STRA (30)	GRVO (30)	BORE (31)	SFOY (30)	SLAU (31)	RACH (32)
OPC02-780	0,55	0,55	0,77	0,77	0,87	0,90	0,73	0,71	0,83	0,80	0,68	0,93	0,87	0,63
OPC02-800	0,41	0,52	0,74	0,77	0,67	0,69	0,90	0,53	0,27	0,90	0,90	0,73	0,65	0,91
OPC02-850	0,48	0,62	0,77	0,87	0,87	0,83	0,77	0,65	0,80	0,83	0,81	0,80	0,90	0,44
OPC05-510	0,32	0,26	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC05-900	0,54	0,19	0,19	0,33	0,20	0,07	0,13	0,09	0,23	0,13	0,19	0,07	0,10	0,28
OPC05-950	0,86	0,89	0,78	0,73	0,60	0,70	0,83	0,59	0,60	0,60	0,84	0,97	0,94	0,84
OPC05-1100	0,32	0,32	0,31	0,30	0,43	0,40	0,20	0,50	0,43	0,60	0,13	0,67	0,52	0,72
OPC05-1110	0,46	0,78	0,66	0,73	0,57	0,67	0,67	0,82	0,80	0,70	0,61	0,37	0,65	0,59
OPC05-1350	0,21	0,56	0,50	0,33	0,50	0,63	0,27	0,56	0,33	0,67	0,52	0,57	0,61	0,22
OPC06-1010	0,77	0,87	0,81	0,80	0,89	0,79	0,93	0,26	0,87	0,57	-	-	-	0,53
OPC06-1100	0,13	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	-	0,7
OPC06-1110	0,03	0,29	0,22	0,17	0,32	0,21	0,37	0,29	0,23	0,2	-	-	-	0,17
OPC11-580	0,24	0,16	0,16	0,17	0,30	0,24	0,10	0,15	0,33	0,13	0,03	0,17	0,16	0,41
OPC11-600	0,03	0,32	0,41	0,23	0,27	0,03	0,20	0,21	0,33	0,30	0,13	0,10	0,39	0,16
OPC11-650	0,97	0,87	0,88	0,90	0,43	0,93	0,70	0,82	0,97	0,93	1,00	0,70	0,74	1,00
OPC11-900	0,17	0,06	0,06	0,17	0,23	0,13	0,10	0,15	0,13	0,13	0,26	0,13	0,19	0,28
OPC11-1120	0,24	0,13	0,03	0,33	0,37	0,37	0,03	0,12	0,20	0,20	0,03	0,37	0,23	0,19
OPC11-1300	0,38	0,77	0,69	0,73	0,87	0,80	0,57	0,62	0,87	0,93	0,61	0,67	0,77	0,78
OPC11-1320	0,10	0,16	0,31	0,37	0,27	0,23	0,27	0,35	0,13	0,37	0,06	0,17	0,35	0,06
OPC15-530	0,57	0,13	0,07	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,03	0,10	0,16	0,27	0,13	0,31
OPC15-730	0,23	0,52	0,60	0,80	0,73	0,80	0,70	0,82	0,50	0,43	0,68	0,80	0,58	0,69
OPD01-590	0,07	0,03	0,06	0,07	0,10	0,07	0,13	0,15	0,5	0,1	0,29	-	0,32	0,06
OPD01-900	0,28	0,19	0,19	0,17	0,50	0,19	0,1	0,18	0,17	0,23	0,32	-	0,32	0
OPD01-1400	0,69	0,48	0,34	0,17	0,37	0,56	0,4	0,26	0,23	0,1	0,22	-	0,26	0,9
OPD03-650	0,77	0,50	0,44	0,70	0,73	0,83	0,63	0,18	0,50	0,67	0,74	0,60	0,81	0,69
OPD03-710	0,37	0,27	0,28	0,43	0,53	0,52	0,27	0,44	0,53	0,20	0,61	0,57	0,68	0,41
OPD03-1030	0,43	0,43	0,25	0,23	0,27	0,07	0,23	0,26	0,23	0,27	0,68	0,07	0,23	0,22
OPD03-1100	0,13	0,07	0,38	0,43	0,47	0,69	0,43	0,53	0,43	0,57	0,35	0,40	0,42	0,28
OPD03-1150	0,47	0,33	0,19	0,20	0,27	0,07	0,17	0,29	0,53	0,13	0,19	0,30	0,13	0,25
OPD03-1400	0,03	0,17	0,28	0,13	0,10	0,17	0,03	0,09	0,17	0,13	-	-	-	-
OPD03-1500	0,20	0,83	0,69	0,67	0,77	0,59	0,67	0,71	0,53	0,63	1,00	0,80	0,71	0,41
OPD03-1700	0,33	0,50	0,53	0,40	0,40	0,52	0,53	0,68	0,40	0,53	0,74	0,43	0,61	0,56
OPD05-2100	0,00	0,87	0,68	0,10	0,23	0,00	0,6	0	0,03	0,07	0,9	0,00	0,03	-
OPD12-1200	0,79	0,71	0,65	0,73	0,63	0,71	0,80	0,47	0,50	0,57	0,87	0,37	0,55	0,56
OPD12-1350	0,27	0,42	0,58	0,67	0,17	0,32	0,27	0,12	0,47	0,20	0,35	0,23	0,32	0,22
OPD20-450	0,20	0,06	0,09	0,17	0,20	0,46	0,10	0,15	0,23	0,07	0,13	0,07	0,06	0,22
OPD20-550	-	-	-	-	-	-	0,37	0,26	0,13	0,30	0,19	0,33	0,35	0,38
OPD20-980	0,53	0,48	0,71	0,50	0,53	0,46	0,43	0,44	0,57	0,43	0,52	0,47	0,35	0,09
OPD20-1120	0,67	0,45	0,56	0,47	0,43	0,46	0,67	0,38	0,37	0,60	0,42	0,43	0,61	0,72
OPD20-2000	0,67	0,77	0,88	0,70	0,90	0,85	0,77	0,74	0,73	0,90	0,81	0,73	0,81	0,56

Tableau 5 (suite)

	DBN (31)	DHC (33)	DA (29)	VOSGES (30)	ALPES (30)	JURA (30)	CHFR (30)	KERT (34)	STRA (30)	GRVO (30)	BORE (31)	SFOY (30)	SLAU (31)	RACH (32)
OPE10-920	0,41	0,47	0,52	0,67	0,70	0,59	0,36	0,56	0,4	0,77	-	-	-	0,42
OPE10-1150	0,77	0,33	0,30	0,13	0,00	0,07	0,21	0,15	0,1	0,13	-	-	-	0,62
OPE10-1290	0,07	0,10	0,06	0,17	0,24	0,26	0,07	0,06	0,1	0,13	-	-	-	0,19
OPE10-1800	0,57	0,70	0,40	0,47	0,25	0,70	0,57	0,7	0,83	0,63	-	-	-	0,53
OPE10-1900	0,67	0,60	0,48	0,67	0,55	0,56	0,28	0,68	0,57	0,8	-	-	-	0,62
OPH10-380	0,30	0,52	0,50	0,63	0,30	0,27	0,27	0,24	0,37	0,63	0,06	0,37	0,45	0,13
OPH10-590	0,60	0,97	0,88	0,80	1,00	0,73	0,80	0,76	0,80	0,90	0,26	0,80	0,84	0,84
OPH10-680	0,47	0,19	0,34	0,47	0,17	0,20	0,20	0,32	0,30	0,13	0,29	0,27	0,16	0,06
OPH10-810	0,73	0,90	0,94	0,87	0,90	0,90	0,90	0,79	0,97	0,93	1,00	0,67	0,87	0,56
OPH10-850	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,15	0,17	0,10	0,00	0,00	0,00	0,06
OPH10-1000	0,23	0,23	0,22	0,27	0,43	0,17	0,13	0,59	0,20	0,23	0,45	0,30	0,39	0,25
DECA0484-790	-	-	-	-	-	-	0,23	0,38	0,52	0,28	0,57	0,60	0,23	0,45
DECA0484-1650	0,23	0,13	0,22	-	-	-	0,10	0,15	0,10	0,23	0,26	0,03	0,10	0,47
DECA0494-650	0,21	0,25	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-730	0,90	1,00	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-860	0,41	0,31	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-890	0,38	0,45	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-1050	0,97	0,97	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-1310	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-1400	0,66	0,79	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-1450	0,76	0,97	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-1700	0,55	0,66	0,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0494-1800	0,76	0,67	0,88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0502-650	1,00	1,00	1,00	1,00	0,62	0,63	1,00	0,47	0,53	0,41	-	0,83	-	1,00
DECA0502-690	0,00	0,00	0,09	0,10	0,31	0,13	0,04	0,09	0,13	0,19	-	0,69	-	0,41
DECA0502-790	0,27	0,52	0,44	0,40	0,45	0,40	0,26	0,53	0,6	0,41	0,39	0,31	0,39	0,25
DECA0502-820	0,47	0,13	0,32	0,10	0,24	0,33	0,17	0,2	0,3	0,22	0,26	0,31	0,39	0,16
DECA0502-910	0,47	0,52	0,44	-	0,07	0,07	0	0,03	0,13	0,18	-	0,24	-	0,16
DECA0502-1010	0,53	0,55	0,56	0,87	0,76	0,80	0,65	0,79	0,9	0,89	-	0,76	-	0,87
DECA0509-890	-	-	-	-	0,76	0,57	0,72	0,79	0,97	0,77	0,83	0,87	0,63	0,65
DECA0509-950	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0509-1250	0,55	0,07	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0509-1450	0,10	0,06	0,31	0,20	0,24	0,27	0,17	0,09	0,33	0,07	0,97	0,40	0,39	0,00
DECA0512-1500	0,10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1	1	1	1	-	-	-	-
DECA0514-520	0,21	0,63	0,32	0,60	0,73	0,77	0,34	0,94	0,57	0,55	-	-	-	0,47
DECA0514-650	0,90	0,60	0,52	0,73	0,87	0,69	0,9	0,85	0,97	0,97	-	-	-	0,66
DECA0514-720	0,03	0,37	0,32	0,17	0,30	0,24	0,9	0,41	0,2	0,21	0,06	0,14	0,03	0,25
DECA0514-725	0,28	0,14	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0514-750	0,03	0,32	0,10	0,27	0,10	0,07	0,13	0,09	0,20	0,23	0,00	0,00	0,39	0,13
DECA0514-1350	0,31	0,33	0,39	0,47	0,23	0,31	0,33	0,32	0,57	0,37	0,13	0,40	0,35	0,63

Tableau 5 (suite)

	DBN (31)	DHC (33)	DA (29)	VOSGES (30)	ALPES (30)	JURA (30)	CHFR (30)	KERT (34)	STRA (30)	GRVO (30)	BORE (31)	SFOY (30)	SLAU (31)	RACH (32)
DECA0514-1700	0,76	0,94	0,90	0,67	0,87	0,90	0,80	0,71	0,80	0,93	0,71	0,57	0,55	0,50
DECA0514-1900	0,66	0,83	0,81	0,90	0,90	0,83	0,63	0,62	0,73	0,80	0,87	0,77	0,74	0,69
DECA0519-620	0,41	0,35	0,22	0,30	0,40	0,48	0,37	0,18	0,40	0,20	0,26	0,50	0,39	0,28
DECA0519-690	0,90	0,74	0,66	1,00	0,77	0,86	0,87	0,88	1,00	0,87	0,84	0,80	0,87	1,00
DECA0519-950	0,10	0,48	0,34	0,50	0,70	0,76	0,40	0,41	0,57	0,40	0,97	0,53	0,84	0,03
DECA0519-1110	0,21	0,03	0,03	0,13	0,20	0,00	0,07	0,26	0,00	0,10	0,03	0,13	0,03	0,41
DECA0519-1550	0,83	0,55	0,63	0,67	0,70	0,45	0,57	0,71	0,63	0,80	0,35	0,33	0,26	0,22
DECA0519-1600	0,64	0,68	0,56	0,80	0,72	0,69	0,57	0,62	0,83	0,67	0,42	0,53	0,55	0,59
DECA0519-1900	0,33	0,10	0,16	0,13	0,34	0,36	0,17	0,18	0,20	0,20	0,26	0,37	0,68	0,25
DECA0519-2500	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0521-580	0,33	0,19	0,22	0,37	0,47	0,40	0,27	0,06	0,17	0,20	0,00	0,40	0,19	0,03
DECA0521-600	0,30	0,45	0,44	0,43	0,40	0,37	0,40	0,09	0,87	0,30	0,39	0,37	0,16	0,63
DECA0521-750	0,17	0,58	0,25	0,20	0,17	0,03	0,40	0,38	0,20	0,10	0,29	0,00	0,10	0,00
DECA0521-800	0,20	0,29	0,22	0,27	0,27	0,10	0,17	0,41	0,27	0,07	0,74	0,93	0,68	0,50
DECA0521-870	0,37	0,13	0,06	0,00	0,00	0,00	0,03	0,06	0	0	-	-	-	-
DECA0521-950	0,33	0,10	0,09	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	-	-	-	-
DECA0521-1850	0,73	0,58	0,69	0,50	0,43	0,77	0,53	0,38	0,67	0,30	0,23	0,13	0,29	0,06
DECA0521-2300	0,87	1,00	0,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DECA0522-800	0,00	0,00	0,03	0,03	0,03	0,10	0,00	0,03	0,10	0,00	0,03	0,17	0,06	0,03
DECA0522-900	0,03	0,17	0,19	0,13	0,23	0,07	0,00	0,03	0,10	0,20	0,00	0,10	0,13	0,13
DECA0522-1050	0,80	0,87	0,94	0,87	0,87	0,87	0,87	0,91	0,80	0,93	0,94	0,90	0,68	0,81
DECA0527-950	-	-	-	0,83	0,87	0,72	-	-	-	-	-	-	-	1,00
DECA0527-580	0,93	0,85	0,72	0,83	0,70	0,63	-	0,87	0,93	0,73	-	-	-	1,00
DECA0527-700	0,16	0,27	0,50	0,33	0,50	0,34	0,67	1,00	0,97	0,87	0,52	0,60	0,68	0,41
DECA0549-510	0,37	0,65	0,75	0,40	0,75	0,79	-	0,65	0,67	0,6	0,84	0,69	0,69	0,61
DECA0549-750	0,87	0,58	0,75	0,83	0,61	0,68	-	0,56	0,53	0,57	0,87	0,86	0,76	0,61
DECA0549-890	0,03	0,10	0,16	0,07	0,00	0,03	-	0	0,07	0,03	0,00	0,1	0,06	0,09
DECA0549-1090	0,57	0,42	0,41	-	-	-	-	0,18	0,14	0,43	0,00	0,21	0,27	0,26
DECA0550-590	0,40	0,32	0,44	0,23	0,50	0,27	0,20	0,15	0,43	0,30	0,81	0,63	0,74	0,69
DECA0550-620	0,30	0,45	0,50	0,47	0,33	0,57	0,47	0,53	0,43	0,73	0,61	0,47	0,61	0,50
DECA0550-690	0,67	0,65	0,84	0,83	0,73	0,57	0,70	0,94	0,90	0,77	0,42	0,40	0,61	0,41
DECA0561-650	0,07	0,13	0,13	0,17	0,13	0,07	0,17	0,26	0,27	0,13	0,16	0,10	0,10	0,16
DECA0561-690	0,13	0,16	0,28	0,13	0,30	0,30	0,20	0,15	0,17	0,17	0,00	0,00	0,23	0,06
DECA0561-720	0,07	0,23	0,19	0,17	0,13	0,47	0,30	0,24	0,57	0,13	0,19	0,27	0,35	0,00
DECA0561-760	0,20	0,45	0,59	0,60	0,63	0,67	0,40	0,74	0,40	0,80	0,06	0,40	0,55	0,22
DECA0561-800	0,87	0,97	1,00	0,83	1,00	0,87	0,87	0,79	0,93	0,83	0,97	0,87	0,97	0,91
DECA0561-970	0,77	0,71	0,45	0,53	0,43	0,37	0,20	0,38	0,40	0,23	0,45	0,07	0,03	0,81
DECA0561-1250	0,17	0,06	0,06	0,03	0,37	0,00	0,07	0,03	0,03	0,07	0,48	0,10	0,10	0,00
DECA0561-1100	0,13	0,23	0,23	0,13	0,20	0,30	0,13	0,15	0,17	0,10	0,06	0,27	0,10	0,09
DECA0561-1800	0,73	0,68	0,88	0,80	0,77	0,77	0,83	0,85	0,83	0,83	1,00	0,90	0,68	0,94

Tableau 5 (suite)

	DBN (31)	DHC (33)	DA (29)	VOSGES (30)	ALPES (30)	JURA (30)	CHFR (30)	KERT (34)	STRA (30)	GRVO (30)	BORE (31)	SFOY (30)	SLAU (31)	RACH (32)
DECA0569-550	0,50	0,58	0,39	0,57	0,63	0,52	0,60	0,79	0,37	0,57	0,65	0,53	0,48	0,38
DECA0569-720	0,03	0,23	0,26	0,23	0,23	0,39	0,27	0,32	0,33	0,33	0,35	0,37	0,26	0,56
DECA0569-890	0,07	0,06	0,03	0,70	0,38	0,29	0,40	0,47	0,13	0,53	0,48	0,50	0,16	0,25
DECA0569-1010	0,03	0,03	0,13	0,17	0,13	0,18	0,17	0,03	0,03	0,00	0,19	0,13	0,00	0,34
DECA0569-1210	0,37	0,32	0,16	0,53	0,23	0,57	0,30	0,21	0,43	0,47	0,13	0,23	0,42	0,25
DECA0573-850	0,00	0,00	0,06	0,07	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,19	0,00	0,00	0,28
DECA0573-1000	0,13	0,07	0,16	0,10	0,10	0,07	0,03	0,03	0,03	0,03	0,19	0,00	0,03	0,00
DECA0573-1190	0,37	0,23	0,06	0,03	0,07	0,03	0,07	0,00	0,03	0,20	0,13	0,00	0,06	0,41
DECA0573-1300	0,30	0,16	0,28	0,07	0,10	0,00	0,10	0,09	0,40	0,17	0,10	0,13	0,32	0,22
DECA0573-1350	0,10	0,19	0,25	0,07	0,07	0,17	0,03	0,24	0,33	0,17	0,10	0,07	0,19	0,13
DECA0573-1480	0,13	0,32	0,41	0,37	0,34	0,33	0,20	0,74	0,33	0,33	0,16	0,20	0,29	0,16
DECA0573-1900	0,07	0,00	0,00	0,13	0,28	0,20	0,03	0,06	0,23	0,10	0,00	0,03	0,16	0,03

DBN : Domaine baltico-nordique ; DHC : Domaine hercyno-carpathique ; DA : Domaine alpin ; CHRF : Chaume Francis ; KERT : Kertoff ; STRA : Straiture ;
 GRVO : Granges/Vologne ; BORE : Boréon ; SFOY : Sainte-Foy-Tarentaise ; SLAU : Saint-Laurent-en-Grandvaux ; RACH : Rachovo ;

II. Les analyses statistiques utilisées

A partir des fragments obtenus nous avons réalisé deux types d'analyses :

- des analyses phénotypiques basées sur la présence/absence des fragments,
- des analyses génotypiques basées sur les fréquences alléliques calculées selon Lynch et Milligan (1994) à partir des fréquences présence/absence des fragments.

II. 1. Les analyses phénotypiques

II. 1. 1. Les Analyses Factorielles des Correspondances (AFC)

Les analyses factorielles permettent de représenter l'information contenue dans un volumineux tableau de données (dans notre cas la matrice "1/0"), sous une forme graphique simple dite "plan factoriel" (Lebart *et al.* 1997). Le passage à cette représentation nécessite la réduction des n dimensions du tableau de données dans un espace à 2 ou 3 dimensions (en général). Pour effectuer cette réduction, on calcule dans un premier temps, les distances entre les profils (lignes ou colonnes) puis, on transforme ces données de façon à optimiser la représentation plane (**Figure 13**).

On peut utiliser différentes méthodes d'analyse factorielle selon la nature des variables à analyser (Benzécri 1973). Dans le cas de données qualitatives telle que la présence/absence de fragments d'ADN, la méthode appropriée est l'analyse des correspondances qui fournit une représentation des associations entre lignes et colonnes, fondée sur une distance entre profils désignée sous le nom de distance du χ^2 (χ^2) :

$$\chi^2 = d^2(i, i') = \sum 1/f_{.j} (f_{ij}/f_{i.} - f_{i'j}/f_{i'.})^2$$

avec,

i, i' : deux individus

f_{ij} : 1 (présence) ou 0 (absence) du fragment j pour l'individu i divisée par le nombre total d'individus

$f_{i.}$: nombre de fragments observés chez l'individu i par rapport au nombre total de fragments observés sur l'ensemble des individus

$f_{.j}$: fréquence du fragment j dans l'ensemble des individus

Contrairement, à la distance euclidienne usuelle qui favorise les fragments à fortes fréquences dans la population, la distance du χ^2 pondère chaque écart par l'inverse de la fréquence de chaque fragment dans la population. Ainsi, la présence d'un fragment peu fréquent aura plus d'effet que celle d'un fragment très fréquent dans le calcul de la distance entre deux individus.

Les transformations et les approximations apportées aux distances calculées entre les individus aboutissent à la constitution d'un nouveau tableau où les individus sont caractérisés par des coordonnées sur des axes factoriels. Ces axes correspondent à des combinaisons particulières des variables d'origine (fragments) construites de manière à maximiser la variance totale. Les

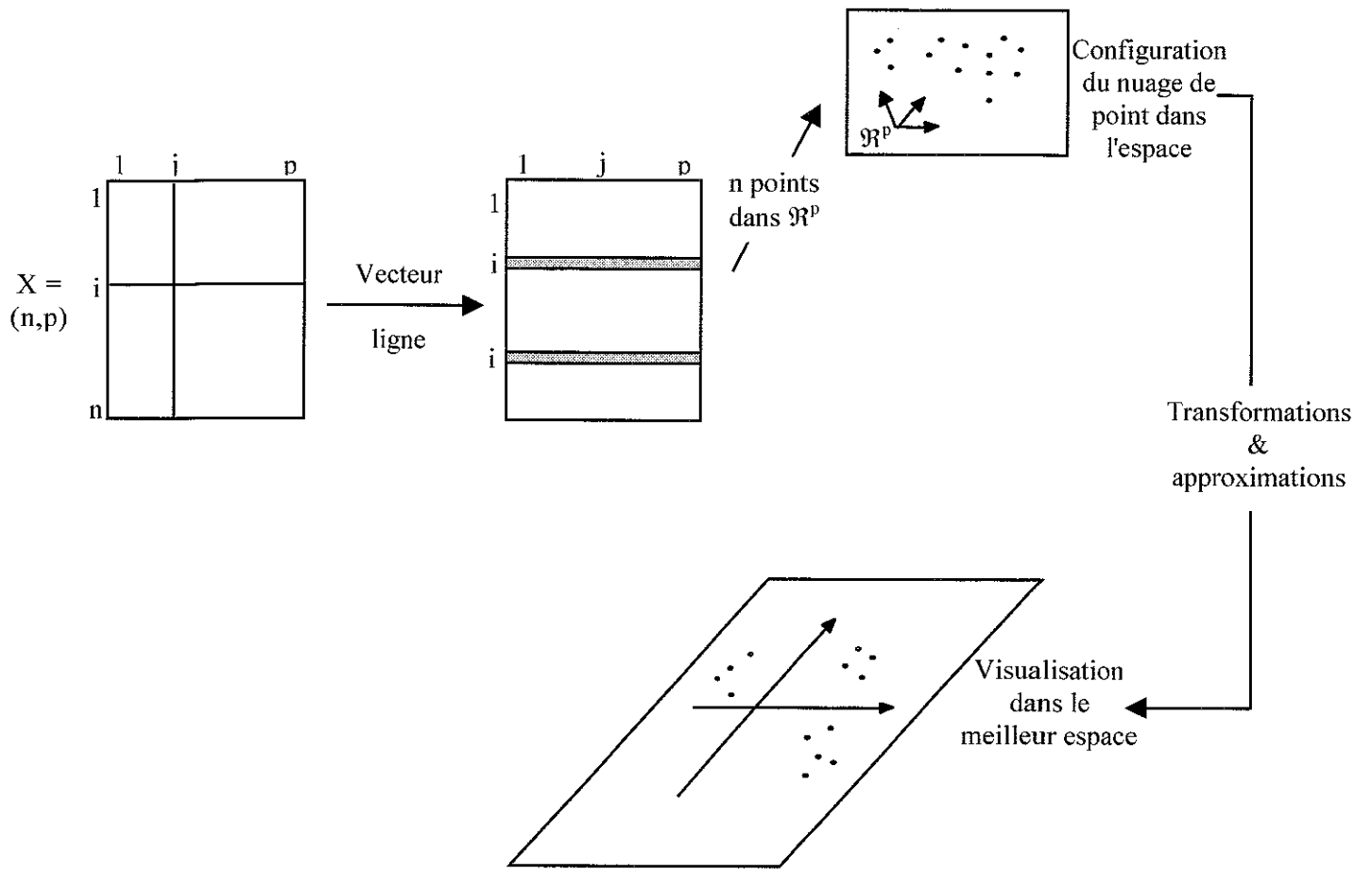


Figure 13 : Principe de l'analyse factorielle

distances entre les points situés dans le plan factoriel constitué des deux premiers axes, donnent ainsi la meilleure représentation plane des distances réelles.

Cette représentation est d'autant meilleure que les pourcentages d'inertie portée par ces axes sont élevés. Les pourcentages d'inertie des axes définissent les "pouvoirs explicatifs" des facteurs : ils représentent la part de la variance (ou inertie) totale prise en compte par chaque facteur.

La signification de chaque axe, peut être recherchée par l'étude de corrélations entre ces axes représentant une combinaison linéaire des variables d'origine, et d'autres axes provenant de variables dites "passives" représentant soit les coordonnées géographiques des individus (latitude, longitude, altitude) ou leurs caractéristiques phénotypiques (hauteur, circonférence...)

Ainsi, la variation observée le long de chaque axe pourra, ou non, être mise en relation avec des variations géographiques et/ou phénotypiques.

Les logiciels utilisés pour réaliser ces AFC sont NTSYSpc 2.02g (Applied Biostatistics Inc, USA) et ADE-4 (Thioulouse *et al.* 1997)

II. 1. 2. Les classifications hiérarchiques ascendantes

Ce type d'analyse permet à partir d'un tableau de données à n dimensions, d'effectuer des groupements de lignes (ou de colonnes) à l'aide d'une démarche algorithmique, et, de visualiser ces groupements sous forme d'une représentation plane appelée "dendrogramme ou arbre".

La classification hiérarchique ascendante est une technique particulière de classification automatique où les groupements se font par agglomération progressive des éléments deux à deux. Il existe plusieurs stratégies de regroupement des éléments, c'est-à-dire de modes de calcul des distances entre les groupements, appelées critères d'agrégation :

- le critère du lien moyen (UPGMA = unweighted pair-group method average) (Sokal et Michener 1958) est très souvent utilisé. Soit K et L deux classes (groupes d'individus) et i et j les éléments de ces classes. La distance entre K et L se calcule par la formule suivante :

$$D_{KL} = \frac{\sum_{i \in K} \sum_{j \in L} d(i,j)}{(N_K N_L)}$$

- le critère du lien complet (complete linkage) (Sorensen 1948), où la distance considérée est la distance entre les individus i et j les plus éloignés (distance maximum) des deux classes K et L :

$$D_{KL} = \max_{i \in K} \max_{j \in L} d(i,j)$$

- le critère du lien court (single linkage) (Sneath 1957 ; Jonhson 1967) où la distance considérée est la distance entre les individus i et j les plus proches (distance minimum) des deux classes K et L :

$$D_{KL} = \min_{i \in K} \min_{j \in L} d(i,j)$$

- le critère selon la variance (Ward 1963) qui consiste à rendre minimale la perte de la variance inter-classe résultant de l'agrégation de deux éléments :

$$D_{KL} = (X_K - X_L)^2 / (1/N_K + 1/N_L)$$

avec,

X_K et X_L , les points moyens des classes K et L .

Les différents critères d'agrégation s'appliquant à un tableau carré symétrique, la matrice rectangulaire asymétrique initiale de type "1/0" doit être transformée préalablement par l'application d'une formule de distance ou de similarité entre les lignes (c'est-à-dire entre les profils de chaque individu).

Les distances et les indices de similarité les plus couramment utilisés dans le cas de données de type 1/0 sont les suivantes :

- Indice de similarité de Jaccard (1908) : $I_J = a/(a+b+c)$
- Indice de similarité de Sokal et Michener (1958) : $I_{SM} = (a+d)/(a+b+c+d)$
- Indice de similarité de Nei et Li (1979) : $I_{NL} = 2a/(e+f)$
- Distance de Jaccard (1908) : $D_J = 1 - I$
- Distance de Nei et Li (1979) : $D_N = - \ln(I)$

avec,

- a , le nombre de fragments commun aux individus 1 et 2
- b , le nombre total de fragments uniquement chez l'individu 1
- c , le nombre total de fragments uniquement chez l'individu 2
- d , le nombre de fragments absents simultanément chez les individus 1 et 2
- e , le nombre total de fragments de l'individu 1
- f , le nombre total de fragments de l'individu 2

Les informations recueillies dans la bibliographie ne permettent pas de conclure sur une combinaison idéale (distances ou similarités / critères d'agrégation). Par conséquent, toutes les combinaisons ont été testées de façon à confirmer la validité des résultats, et, seule la combinaison donnant le maximum d'informations interprétables a été représentée.

Les classifications hiérarchiques ont été réalisées avec le logiciel ADE-4 (Thioulouse et al. 1997).

II. 1. 3. Les mesures de diversité

II. 1. 3. 1. L'Analyse MOléculaire de la Variance (AMOVA)

Cette méthode permet de décomposer la variance moléculaire en fonction de différents niveaux hiérarchiques (Excoffier *et al* 1992).

Elle utilise le fait qu'une somme de déviations au carré, entre les observations individuelles et leur moyenne, est égale à une double somme des différences au carré (distances) entre les paires d'observations, plus une constante.

Ainsi, l'analyse de la variance moléculaire est réalisée à partir d'une matrice de distance au carré entre toutes les paires d'observations.

Pour les calculs réalisés dans ce travail, nous avons retenu la distance Euclidienne proposée par Excoffier *et al.* (1992) :

$$\delta_{xy}^2 = \sum_{i=1}^s (x_i - y_i)^2$$

avec,

x et y , les données de deux individus (1 ou 0) pour le fragment i
 s , le nombre de dimensions sur lesquelles x et y sont comparées.

Dans le cas de fragments RAPD, la distance Euclidienne au carré, se résume à la différence du nombre de fragments polymorphes entre deux individus.

La variance totale calculée est décomposée : entre groupes de populations, entre populations au sein des groupes, entre individus au sein des populations. Le degré de signification de la variance totale est évalué par une procédure de permutation :

$$\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2$$

avec,

σ^2 la variance totale
 σ_a^2 , σ_b^2 , σ_c^2 , les variances à chaque niveau hiérarchique a , b et c (entre groupes, entre populations à l'intérieur des groupes et à l'intérieur des populations).

Cette analyse de la variance moléculaire permet également d'estimer des analogues des F-statistiques appelés Φ -statistiques qui correspondent aux corrélations entre les profils pris aléatoirement à un niveau hiérarchique considéré.

$$\Phi_{st} = (\sigma_a^2 + \sigma_b^2) / \sigma^2$$

$$\Phi_{ct} = \sigma_a^2 / \sigma^2$$

$$\Phi_{sc} = \sigma_b^2 / (\sigma_b^2 + \sigma_c^2)$$

avec,

Φ_{st} , corrélation dans une population

Φ_{ct} , corrélation dans un groupe de populations

Φ_{sc} , corrélation dans l'espèce

Ces analyses ont été réalisées à l'aide des logiciels AMOVA-PREP (Miller 1998) et WINAMOVA Vs 1.55 (Excoffier *et al.* 1992)

II. 1. 3. 2. Les indices de diversité de Shannon

Pour les données qualitatives, à partir desquelles on ne peut calculer ni moyenne ni variance, un indice de diversité H' prenant en compte la distribution des observations par catégorie, a été défini par Shannon (1948).

$$H' = \sum_{i=1}^k p_i \log_2 p_i$$

avec,

k , le nombre de catégories

p_i , la proportion des observations trouvées dans la catégorie i .

Cet indice peut être calculé avec tous les logarithmes (bases 10, e et 2).

Pour un lot de données constituées de k catégories on peut calculer $H_{\max} = \log k$ qui correspond à la diversité maximum. A partir de H_{\max} , on peut déduire la diversité relative J' définie comme la diversité observée par rapport à la diversité maximum :

$$J' = H' / H_{\max}$$

Les marqueurs RAPD représentent un cas particulier puisque les données se classent en seulement 2 catégories (présence et absence). La diversité maximale, en utilisant le logarithme de base 2, est égale à de 1 ($H_{\max} = \log_2(2) = 1$)

Par conséquent, dans notre cas et en utilisant les logarithmes de base 2, H' est égale à J' .

On peut en outre utiliser l'indice de diversité de Shannon pour décomposer la diversité totale en diversité inter et intra-groupes. Par exemple, si H_{sp} est la diversité au sein d'une espèce, H_{pop} la diversité moyenne des populations, alors la part de la diversité est :

- dans les populations : H_{pop}/H_{sp}
- entre les populations : $H_{sp} - (H_{pop}/H_{sp})$

II. 2. Les analyses génotypiques

II. 2. 1. Les fréquences alléliques

Pour calculer des fréquences alléliques en l'absence d'information génotypique, ce qui est le cas pour les fragments RAPD, on admet que :

- les allèles de différents loci ne co-migrent jamais dans un gel,
- chaque locus a un déterminisme bi-allélique

Les deux phénotypes moléculaires présence [A] et absence [a] d'un fragment correspondent en réalité à trois génotypes (AA), (Aa) et (aa) (les hétérozygotes (Aa) et les homozygotes (AA) présentent le même phénotype [A]).

Si l'on note p la fréquence de l'allèle "A" et q la fréquence de l'allèle "a" dans une population diploïde, les estimations des fréquences P des trois génotypes sont alors :

$$\begin{aligned} P(AA) &= p^2(1-F_{is}) + pF_{is} \\ P(Aa) &= 2pq(1-F_{is}) \\ P(aa) &= q^2(1-F_{is}) + qF_{is} \end{aligned}$$

avec

F_{is} , la valeur du coefficient de fixation. Il représente l'écart en hétérozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg (Wright 1951).

Lorsque les populations sont en équilibre panmictique, comme c'est le cas chez l'Epicéa (Muona *et al.* 1990 ; Konnert communication personnelle), la valeur de F_{is} est égale à 0.

Il devient alors possible de calculer directement la fréquence de l'allèle nul "a" (q) dans la population et donc d'en déduire la fréquence de l'allèle "A" (p) :

$$P(aa) = q^2 \Leftrightarrow q = [P(aa)]^{1/2} \Leftrightarrow p = 1 - q \Leftrightarrow p = 1 - [P(aa)]^{1/2}$$

Sur la base de ce calcul, Lynch et Milligan (1994) ont proposé une estimation de la valeur des fréquences alléliques prenant en considération le nombre d'individus échantillonnés (N) dans la population analysée :

$$q = [P(aa)]^{1/2} (1 - \text{Var}(x)/8x^2)^{-1} \quad \text{et} \quad \text{Var}(q) = (1-x)/4N$$

II. 2. 2. Les paramètres de diversité et de différenciation génétique de Nei

II. 2. 2. 1. La diversité génétique

La proportion de gènes hétérozygotes dans une population en équilibre de Hardy-Weiberg se mesure par la valeur H_e (Wright 1965, Nei 1973 et 1977). Cette valeur exprime la probabilité pour que 2 gènes tirés au hasard dans une population soient différents :

Le taux d'hétérozygotie estimé H_e dans une population correspond à la moyenne des taux d'hétérozygoties h estimés à chaque locus dans cette population :

$$h = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

$$H_e = 1/L * \sum_{i=1}^L h$$

avec,

p_i , la fréquence du $n^{\text{ème}}$ allèle
 L , le nombre de loci i

Les marqueurs RAPD ayant un déterminisme bi-allélique, h peut s'écrire :

$$h = 1 - (p^2 + q^2) = 2q(1-q)$$

La détection d'allèles rares étant liée à la taille de l'échantillon, il est conseillé de ne pas prendre en compte dans l'analyse les fragments dont la fréquence est supérieure à $1 - (3/N)$ afin de ne pas sous-estimer le nombre d'hétérozygotes dans la population (Lynch et Milligan 1994).

Lynch et Milligan 1994 proposent en outre une estimation moins biaisée de la valeur de H_e en appliquant les formules suivantes :

$$h = 2q(1-q) + 2\text{Var}(q) \quad \text{Var}(h) = 4[1-q]^2\text{Var}(q)$$

$$H_e = 1/L * \sum_{i=1}^L h \quad \text{Var}(H_e) = 1/[L(L-1)] * \sum_{i=1}^L [h-H_e]^2$$

avec,

L , le nombre de loci i

Nous avons calculé les indices de diversité selon les formules proposées par Lynch et Milligan (1994), soit pour tous les fragments polymorphes soit pour ceux dont la fréquence est supérieure à $1-3/N$.

II. 2. 2. 2. La différenciation génétique

La diversité génétique peut-être estimée à différents niveaux hiérarchiques :

- au niveau des populations : diversité intrapopulation (H_s)

$$H_s = 1/n * \sum_{n=1}^n H_e$$

avec,

n, nombre de populations

H_e , diversité estimée dans les populations

- au niveau de l'espèce : diversité totale (H_t)

$$H_t = 1/L * \sum_{i=1}^L h_t$$

avec,

L, nombre de locus

h_t , taux d'hétérozygotie estimés à chaque locus en considérant les n populations comme une population

A partir de ces deux paramètres il est possible de déduire la part de la diversité (D_{st}) responsable de la différenciation génétique :

$$D_{st} = H_t - H_s$$

Le plus souvent celle-ci est exprimée en pourcentage de la diversité génétique totale sous la forme du coefficient de différenciation génétique de Nei :

$$G_{st} = D_{st}/H_t = 1 - (H_s/H_t)$$

II. 2. 3. *La distance génétique entre les populations*

La distance génétique entre 2 populations est une mesure des différences de fréquences alléliques entre ces deux populations (Nei 1987).

Nous avons utilisé la distance génétique standard (Nei 1972) et la distance génétique standard non-biaisée (Nei 1978).

II. 2. 3. 1. La distance génétique standard (Nei 1972)

Soit x_i et y_i les fréquences de l'allèle A_i dans les populations X et Y. Si l'on procède à des tirages aléatoires dans chacune des populations, la probabilité de tirer le même allèle est $j_{xy} = \sum x_i y_i$

De même, la probabilité de tirer deux fois le même allèle dans chacune des populations est $j_x = \sum x_i^2$ et $j_y = \sum y_i^2$, respectivement.

J_x , J_y , et J_{xy} sont les moyennes des j_x , j_y et j_{xy} calculés à chaque locus.

On peut alors calculer l'identité génétique I (égale à 1 quand les deux populations ont des fréquences de gènes identiques à tous les loci et égale à 0 quand il n'y a aucun allèle en commun) :

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

La distance génétique standard est alors :

$$D = - \ln I$$

II. 2. 3. 1. La distance génétique non biaisée (Nei 1978)

En pratique, il est impossible d'analyser tout les loci d'une population. Nei (1978) propose donc d'estimer la distance génétique en prenant en compte le nombre d'individus échantillonnés dans chaque population (n_x et n_y), ainsi que le nombre de loci examinés :

$$D = -\ln \hat{I}$$
$$\hat{I} = \hat{J}_{xy} / (\hat{J}_x \hat{J}_y)^{1/2}$$

avec,

$$\hat{J}_x = (2n_x \sum x_i - 1) / (2n_x - 1)$$

$$\hat{J}_y = (2n_y \sum y_i - 1) / (2n_y - 1)$$

$$\hat{J}_{xy} = J_{xy}$$

Les analyses génotypiques ont été réalisées à l'aide des logiciels POPGENE Vs 1.31 (Yeh *et al.* 1997) ; TFPGA (Miller 1997) ; NTSYSpc Vs 2.02g (Applied Biostatistics inc. 1998) et EXCEL 95.

Bibliographie

- Benzécri JP (1973).** *L'analyse des données. Tome 1 : La taxinomie. Tome 2 : L'analyse des correspondances.* 2nd Edition. Dunod, Paris.
- Bodénès C, Laigret F, Joandet S, Kremer A (1997).** Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Heredity* 78 : 433-444
- Dhillon SS (1987).** *DNA in tree species.* Dans, *Cell and tissue culture in forestry*, pp. 298-313 Edité par Bonga JM, Deuzan DJ. Martinus Nijhoff publisher, Dordrecht.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19 : 11-15

- 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
- Hadrys H, Balick M, Schierwater (1992).** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1 : 55-63
- Hartl D, Clark AG (1989).** *Principles of population genetics*, 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Jaccard P (1908).** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaud Sci Nat* 44 : 223-270.
- Jonhson SC (1967).** Hierarchical clustering schemes. *Psychometrika* 32 : 241-254
- Lebart L, Morineau A, Piron M (1997).** *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, Paris.
- Loomis WD (1974).** Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol* 31 : 528-545
- Lynch M, Milligan BG (1994).** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3 : 91-99
- Miller MP (1998).** AMOVA-Prep 1.01, A program for the preparation of AMOVA input files from dominant-marker raw data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University.
- Miller MP (1997).** Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), Departement of Biology, Northern Arizona University.
- Muona O, Paul L, Szmidt AE, Kärkkäinen K (1990).** Mating system analysis in a central and northern European population of *Picea abies*. *Scand J For Res* 5 : 97-102
- Nei M (1972).** Genetic distance between populations. *Amer Nat* 106: 283-292
- Nei M (1973).** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70 : 3321-3323
- Nei M (1977).** F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum Genet* 41 : 225-233
- 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.
- Nei M, Li WH (1979).** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 5269-5273
- Passerieux E (1998).** Evaluation de la diversité génétique des sous-populations embryogènes issues de deux lots de semences de *Picea abies* (L.) Karst. Thèse de l'Université de Bourgogne.
- Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G (1993).** Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR methods Applic* 2 : 341-345
- Shannon C (1948).** A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal* 27 : 379-423 ; 623-656
- Skov E (1998).** Are RAPD markers reproducible between different laboratories? A case of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genet* 47: 283-287

- Sneath PHA (1957).** The application of computers to taxonomy. *J Gen Microbiol* 17 : 201-226
- Sneath PHA, Sokal RR (1973).** *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.* Freeman WH and Co, San Francisco.
- Sokal RR, Michener CD (1958).** A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38 : 1409-1438
- Sorensen T (1948).** A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish common. *Biologiske Skrifter* 5: 1-34
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier JP (1997).** ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat Comp* 7 : 75-83.
- Ward JH (1963).** Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Amer Stat Ass J* March : 236-244
- Wilkie SE, Isaac PE, Slater RJ (1993).** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor Appl Genet* 86 : 497-504
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 6531-6535.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993).** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 218 : 704-740
- Wright S (1951).** The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15 : 323-354
- Wright S (1965).** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19 : 395-420
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T, Mao JX (1997).** POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Chapitre II : Variation à l'échelle de l'aire naturelle totale

L'étude des variations sur l'ensemble de l'aire naturelle de l'Epicéa a été réalisée à partir d'un dispositif de comparaison de provenances mis en place en 1964/68 par l'INRA sous l'impulsion de l'IUFRO (Union Internationale des Organismes de Recherches Forestières). Ce dispositif qui comporte 13 sites expérimentaux (12 en Europe et 1 au Canada), est représenté dans le Nord-Est de la France en forêt d'Amance près de Nancy (54). Le site d'Amance comporte 25 934 individus issus de 1100 provenances (25 à 30 individus/provenance), originaires d'une vingtaine de pays et de 96 régions écologiques différentes, couvrant ainsi l'ensemble de l'aire naturelle de l'espèce. Les 1100 provenances ont été réparties dans 11 sous-expériences chacune composée de 25 blocs afin de pouvoir estimer l'effet lié au terrain.

Ce site a fait l'objet, depuis 1971, de nombreuses mesures et observations concernant des caractères quantitatifs tels que la mortalité, la croissance, la phénologie ou la qualité du bois. Elles ont été analysées par Hervé Van de Sype et ont fait l'objet d'un premier bilan dans un mémoire de stage (Ruffieux 1996).

Nous avons utilisé le même dispositif pour analyser la variation moléculaire à partir d'une sélection de 93 provenances représentatives des 3 domaines de l'aire.

Les mécanismes d'évolution de ces deux types de caractères sont très différents. Les gènes codant pour les caractères quantitatifs évoluent très rapidement sous l'effet du milieu alors que les fragments amplifiés par la technique RAPD, probablement issus en majorité de la fraction non-codante du génome, évoluent en principe plus lentement par dérive génétique.

La confrontation des informations obtenues avec l'un ou l'autre de ces deux types de marqueurs peut se révéler intéressante pour mieux comprendre l'histoire glaciaire et/ou postglaciaire de l'Epicéa.

Elle a été réalisée dans l'article suivant : "Quantitative traits and RAPD variation in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.)", soumis.

Quantitative traits and RAPD variation in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.)

Anne-Marie Collignon^a, Hervé Van de Sype^b and Jean-Michel Favre^a

Abstract: Quantitative traits and RAPD variations were investigated on the whole natural area of *Picea abies*. Results showed that the species can be separated into two main groups (northern and central Europe) using both types of markers. Such spatial and geographical fragmentation of species natural area rarely occurs in conifers and is consistent with prolonged geographical isolation within two refugial zones located in distinct environmental conditions (Moscow area and east of central Europe mountains). Within each of these two infraspecific groups, we revealed an apparent uncoupling between quantitative traits (related to growth, phenology and wood quality) and DNA. However, the combination of both molecular and quantitative traits informations provided new insights about geographical pattern of variation: dominant latitudinal gradient was found in the Baltico-Nordic domain contrasting markedly with the main east west migration expected from pollen data, while in central Europe, noticeable longitudinal gradient was congruent with east-west migration. The concordance and discrepancies between quantitative traits and DNA are discussed in terms of historical events in *Picea abies*.

Keywords: Phenological and Morphological variation; DNA variation; *Picea abies*; Postglacial migration

I. Introduction

The management of genetic resources for gene conservation or for long term breeding programmes requires good knowledge of the whole native variability which has been largely influenced by climate history (Bartlein 1988; Huntley 1996) and human actions (Markgraff 1970).

Picea abies (Norway spruce) presents a wide Europe distribution, extending from Atlantic ocean to Ural mountains and from Northern Norway to Greece. Such adaptation to thrive in various environmental conditions (mediterranean to boreal climate and plain to mountain habitats) presupposes relatively high level of intraspecific genetic variation (Bergmann & Gregorius 1979).

The natural variation of this coniferous species has been extensively described using phenological, morphological, and physiological adaptative traits as well as molecular markers, especially allozymes (Müller-Starck *et al.* 1992 ; Krutovskii & Bergmann 1995, for review).

Adaptative traits (usually quantitative traits) and molecular markers are submitted to different evolutionary forces. The first ones are largely influenced by the environmental pressure and depend on the natural selection. Narrow crown trees such as *Pendula* phenotype in Finland (Schmidt-Vogt 1986) or columnar phenotype at high altitude in Vosges and Jura mountains, for instance (Bouvarel 1954 ; Bouvarel & Jacamon 1959), are favoured in stands subjected to strong wind, snow or frost. Similarly, extreme early time of flushing and growth cessation generally occur at high latitude (Scandinavia and Finland) and altitude (central Alps) (Krutzsch 1992). Conversely, the latest flushing trees are observed in Belorussia, north-eastern Poland and in the interior of the Baltic Republics, whereas growth cessation comes later in more southern latitudes such as southern Poland and the Eastern Carpathian mountains, the exception being the Alps where growth cessation becomes earlier with increasing altitude (Krutzsch 1992).

In contrast to the adaptative traits, molecular markers are mostly governed by random genetic drift (Kimura 1983).

The phenotypical selection of traits of interest in forestry are usually delayed owing to the specific biological characteristics of trees species (long generation time, long live span and late sexual maturity).

Thus, the question of the relationship between variation of adaptative traits and molecular markers is obviously of prime interest for tree improvement and will be valuable in developing strategies for markers mediated selection. However, this point still remains poorly investigated in conifers (Karhu *et al.* 1996). In the case of *Picea abies*, a good concordance between allozyme and morphological variation on the whole distribution area has been interestingly evidenced by Lagercrantz and Ryman (1990). Two interpretations have been proposed by these authors. First, some sort of environmental gradient imposed a selective pressure on isozyme loci as well as on morphological characters. Alternatively, current morphological traits could reflect ancient adaptation to refugial environment. Lagercrantz and Ryman (1990) considered this second explanation more plausible.

In this paper, we compared quantitative traits and RAPD variation within the *Picea abies* natural distribution area. In contrast with allozymes representing coding region and for which possible effect of natural selective pressure cannot be totally discarded (Nevo 1988), the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD, Williams *et al.* 1990) provides the opportunity to easily and rapidly generate a quasi-unlimited number of markers at the DNA level including coding and non-coding, single copy, or repetitive DNA (Hadrys *et al.* 1992; Bachmann 1994).

As commonly observed in gymnosperms, Norway spruce is characterised by a large genome (29.6 pg/2C, Dhillon 1987) mainly composed of non-coding region (70%), increasing probability for random DNA markers to originate from loci free from selective pressure. Thus, RAPDs can

be considered as well suited for detection of neutral polymorphism (Hadrys *et al.* 1992 ; Bucci & Menozzi 1993).

Our objectives were to describe (1) the quantitative traits variation, (2) the RAPD variation, and (3) the relation between these two types of variation.

To develop this analysis, we took advantage of the IUFRO 1964/68 experiment which pooled together provenances covering the whole area of Norway spruce in the same environmental conditions. Moreover the particular design of this experiment allowed to adjust each provenance to local environmental effects, so that quantitative traits variation essentially reflected genetic differences and could be compared to DNA variation.

II. Materials and methods

II. 1. IUFRO (1964/1968) testing programme description

Seeds from 1100 provenances have been collected on the whole distribution area of *Picea abies*. This material was classified (Kruttsch 1974) into 3 domains, according to the putative glacial refuges and 96 regions, based on ecological conditions (climate and elevation). After four years growth in the nursery, plants were shared into 20 sites located in 13 countries (Kruttsch 1974 ; Persson *et al.* 1992).

The French site is located in north-eastern France near Nancy in Lorraine (Amance forest : 6°18 E, 48°47 N, 240 m). The Lorraine region is appropriate for Norway spruce growth with a semi-continental climate and an average annual rainfall of 700 mm.

Four years old seedlings were planted in 1968 with spacing of 1.1 m x 1.1 m on hydromorphic stand characterised by a stagnic cambisol, the centre being the most hydromorphic part. The experiment is composed of 11 subexperiments, each of them constituted of 100 provenances scattered among 25 blocks of 100 single-tree plots.

II. 2. Quantitative traits analyses

General Sampling and measured traits - A total of 26,000 trees were examined. Among the 18 measured traits, only five have been used in order to equilibrate the weight of traits and to avoid high correlations between comparable traits. At the age of 8, the terminal bud burst was noted (day number) from 6 observations made between May 2nd (day 0) and June 5th (day 35). At the age of 16, the total height was measured and the mortality rate was determined. At the age of 17, 50% of trees were felled in a diagonal systematic thinning. At the age of 23, girth was measured at 1.30 m high and wood density at the same height was estimated with a penetrometer ("*Pilodyn*") and expressed in millimetres of pin penetration.

In order to compare all provenances from all subexperiments, data from the 26,000 trees were either scaled (mortality rate) or adjusted for environmental effects (quantitative traits).

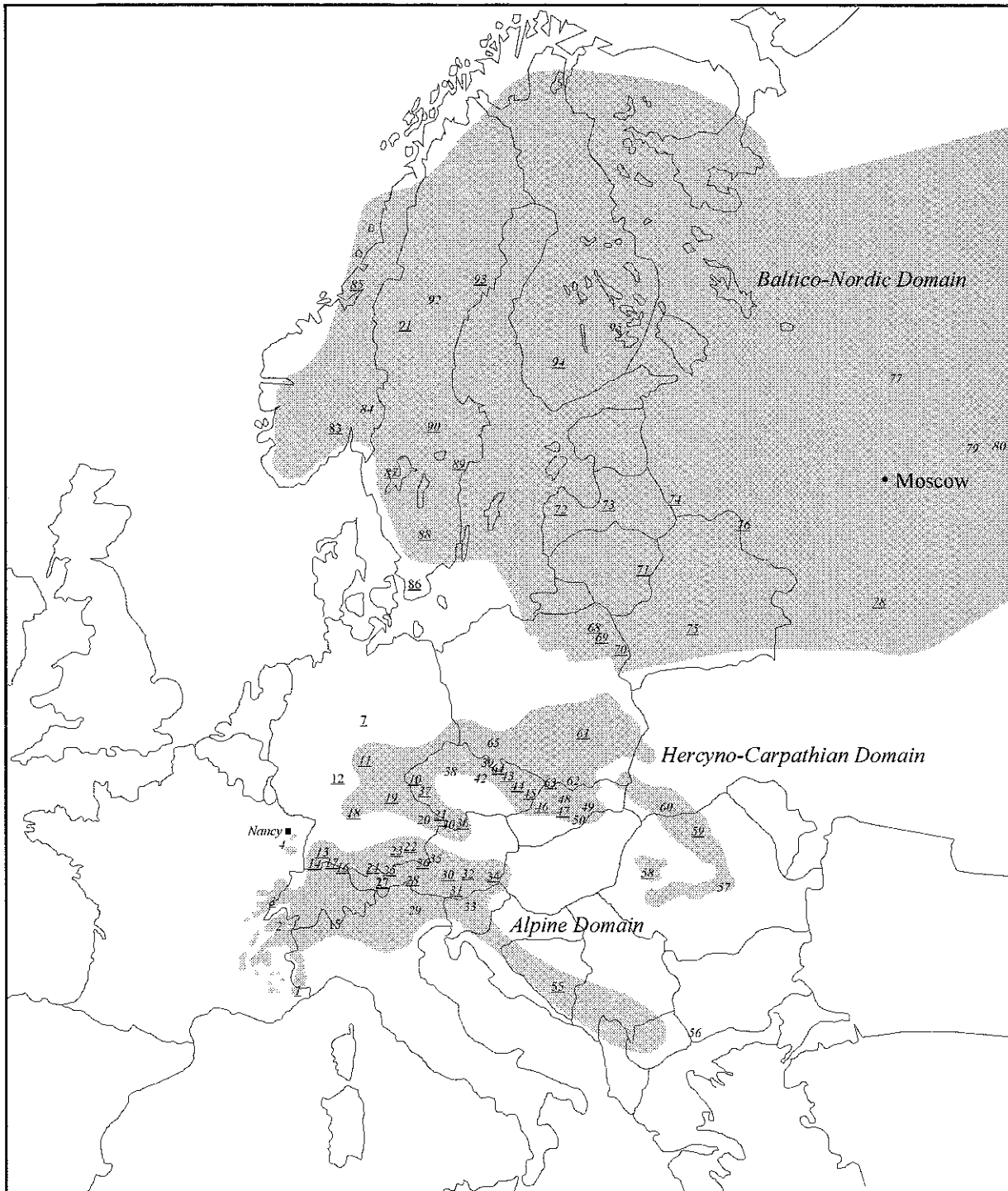


Figure 1: Natural distribution area of *Picea abies* in Europe (3 shaded domains) and location of the regions (number) investigated in this study. Underlined numbers correspond to regions analysed using RAPD and Italic numbers to regions analysed using quantitative

Mortality rates (MR) were scaled (MR') for each provenance (l) according to [1] :

$$[1] \text{MR}'_l = (\text{MR}_l - \mu_p) / \sigma_p$$

where μ_p and σ_p correspond to mean and standard deviation within subexperiment (p) including provenance l.

For quantitative traits (bud burst, total height, girth and *Pilodyn*) data (X_{lpq}) were analysed with a nested ANOVA and then adjusted (X'_{lpq}) to environmental effects of subexperiment p (E_{Sp}) or block q ($E_{b_{q/p}}$) according to [2]:

$$[2] X'_{lpq} = X_{lpq} - E_{Sp} - E_{b_{q/p}} + \mu$$

where μ is the total mean over subexperiments.

Specific sampling for study the structure of the natural variability - In order to describe the structure of the natural variability, a sampling of provenances was built up to offer the best representation of the geographical variability. 674 of the 1100 provenances were discarded step by step as follows:

- (a) 47 for unavailable or suspected data (geographical co-ordinates or region numbers),
- (b) 240 for location in a non native region according to their geographical location,
- (c) 145 for seed collection from too small number of trees,
- (d) 54 for low accuracy of estimations (less than 7 trees measured at age 23),
- (e) 188 for excessive representation within a region.

To achieve step (e), a geographical variability index was computed for each region and zone on the 614 remaining provenances after step d according to [3]:

$$[3] \sigma(\text{latitude}) \times \sigma(\text{longitude} \times \cos(\text{latitude} \times \pi/180)) \times \sigma(\text{altitude}/200)$$

Longitude was transformed to take into account the world curvature. Altitude was reduced so that variances of the three geographical parameters were made comparable. The number of provenances per region was reduced in order to equilibrate this index without changes of variability (mean and variance) for geographical information and data measurements.

After these successive steps, the remaining sampling was composed of 426 provenances representing 3 domains and 75 regions (Fig. 1).

Univariate analyses - The structure of the variability has been estimated for each trait (426 provenances) according to the nested model [4] from provenance mean (μ) of adjusted (quantitative traits) or scaled data (mortality rates), so that every provenance have the same weight:

$$[4] P'_{ijk} = \mu + E_{d_i} + E_{r_{j/i}} + \varepsilon_{k/ij}$$

where P'_{ijk} is the mean of a given trait for provenance k within region j and domain i. E_d , E_r and ε are the domain, region and residual effects, respectively. The resulting estimates of mean square (nested ANOVA) were compared via the Fisher's F test.

Table 1: List of the *Picea abies* trees sampled within the France IUFRO testing-programme and used in the RAPD analysis

<i>Code</i>	<i>Long.</i>	<i>Lat.</i>	<i>R</i>	<i>D</i>	<i>Country</i>	<i>Code</i>	<i>Long.</i>	<i>Lat.</i>	<i>R</i>	<i>D</i>	<i>Country</i>
0120	13°9	55°6	86	1	Sweden	0152	17°8	49°2	45	2	Czech Republic
0168	13°4	57°5	87	1	Sweden	0150	20°2	49°0	45	2	Slovakia
0703	14°8	56°3	88	1	Sweden	0745	19°3	49°1	46	2	Slovakia
0159	14°0	58°3	88	1	Sweden	0187	18°9	49°0	46	2	Slovakia
0704	14°2	57°6	88	1	Sweden	0176	19°9	49°0	47	2	Slovakia
0705	16°4	59°1	89	1	Sweden	0661	18°8	49°6	63	2	Slovakia
0644	14°7	59°5	90	1	Sweden	0767	10°8	51°8	7	2	Germany
0167	14°6	59°0	90	1	Sweden	0740	13°3	50°7	10	2	Germany
0763	15°3	59°9	90	1	Sweden	0100	10°7	50°7	11	2	Germany
0639	14°1	61°3	91	1	Sweden	0645	8°9	49°9	12	2	Germany
0162	15°4	62°5	91	1	Sweden	0105	13°3	48°9	21	2	Germany
0134	19°9	63°9	93	1	Sweden	0192	10°1	49°1	18	2	Germany
0128	10°7	50°0	83	1	Norway	0121	12°3	49°5	19	2	Germany
0651	10°5	63°3	85	1	Norway	0793	13°4	48°6	20	2	Germany
0609	22°5	61°5	94	1	Finland	0173	13°2	49°1	21	2	Germany
0607	26°3	55°4	71	1	Belarus	0188	13°3	48°9	21	2	Germany
0111	28°7	53°3	75	1	Belarus	0625	15°5	48°6	36	2	Austria
0606	26°5	54°1	75	1	Belarus	0170	7°3	44°0	1	3	France
0659	21°8	57°5	72	1	Latvia	0119	6°1	46°8	3	3	France
0151	22°3	57°0	72	1	Lithuania	0185	8°5	48°0	13	3	Germany
0163	22°3	56°8	72	1	Lithuania	0114	8°5	47°8	14	3	Germany
0690	24°3	56°4	73	1	Lithuania	0112	8°5	46°5	15	3	Switzerland
0756	27°4	58°1	74	1	Estonia	0116	8°8	46°5	15	3	Switzerland
0106	28°5	57°0	74	1	Russia	0103	9°7	48°0	16	3	Germany
0743	30°2	55°1	76	1	Russia	0197	8°9	48°3	17	3	Germany
0744	32°0	56°5	76	1	Russia	0760	9°2	48°0	17	3	Germany
0107	33°7	53°3	78	1	Russia	0129	12°2	48°1	22	3	Germany
0156	22°2	54°1	68	1	Poland	0123	10°5	48°1	23	3	Germany
0710	23°3	53°3	69	1	Poland	0195	10°2	48°0	23	3	Germany
0146	23°6	52°6	70	1	Poland	0715	10°6	48°1	23	3	Germany
0656	23°8	52°7	70	1	Poland	0780	10°9	48°1	23	3	Germany
0630	21°3	50°5	61	2	Poland	0660	10°3	48°7	24	3	Germany
0136	19°1	49°5	63	2	Poland	0127	11°1	47°5	25	3	Germany
0613	22°7	46°7	58	2	Romania	0124	12°9	47°7	26	3	Germany
0635	25°4	46°9	59	2	Romania	0115	10°1	47°2	27	3	Austria
0755	25°5	47°8	59	2	Romania	0110	12°5	47°0	28	3	Austria
0731	12°3	50°1	10	2	Czech Republic	0122	13°2	47°3	28	3	Austria
0181	13°8	48°9	21	2	Czech Republic	0137	13°8	47°1	30	3	Austria
0702	14°8	48°8	36	2	Czech Republic	0198	13°9	47°5	30	3	Austria
0184	13°6	49°5	37	2	Czech Republic	0696	14°1	46°8	31	3	Austria
0161	13°0	49°5	37	2	Czech Republic	0738	14°5	47°0	31	3	Austria
0139	17°3	49°8	43	2	Czech Republic	0102	14°1	46°8	31	3	Austria
0178	17°3	50°3	43	2	Czech Republic	0153	15°3	47°6	32	3	Austria
0191	17°1	49°5	44	2	Czech Republic	0190	15°2	47°4	32	3	Austria
0164	16°5	50°2	64	2	Czech Republic	0104	15°8	47°6	34	3	Austria
0145	17°8	49°2	45	2	Czech Republic	0601	19°5	43°9	55	3	Serbia
0736	18°3	49°3	45	2	Czech Republic						

Code= IUFRO provenances code ; Long.=Longitude East ; Lat.=Latitude North ; R= Region ; Z= Zone ;
D=Domains (1=Baltico-Nordic, 2=Hercyno-Carpathian, 3=Alpine) ;

Multivariate analyses - Multitrait variations were synthesized by the way of two methods.

The five quantitative traits on the 75 regions were analysed by UPGMA cluster analysis based on Euclidean distance matrix. A region was considered as the average of the included provenances.

Principal component analysis (PCA) was computed on the five traits of the 426 provenances (active traits). Geographical data were used as passive traits (Moreau *et al.* 1997). Provenances principal components were subsequently analysed using a nested ANOVA [4]. Computation and statistics were written in Splus language (1996).

II. 3. RAPD analyses

Sampling - The sample was composed of 93 provenances (Fig. 1 and Table 1), classified into 61 regions, originating from the Baltico-Nordic (31 trees), Hercyno-Carpathian (33 trees) and Alpine domains (29 trees).

DNA extraction - After collection, needles were frozen in liquid nitrogen, then stored at -80°C. DNA was extracted from 1 g of needles according to the protocol of Doyle and Doyle (1987) with 1% 2-mercaptoethanol (v/v) and 1% PVP 40,000 (w/v) added in the CTAB extraction buffer. Purification was performed using chloroforme-octanol (24:1) and the DNA pellets were washed with 70% ethanol before the final suspension step. DNA concentrations were determined by comparison with serial dilutions of standard lambda DNA.

RAPD analysis - DNA amplification was performed according to Williams *et al.* (1990). 196 random decamer primers obtained from Operon Technologies (Alameda, USA) and Genosys Biotechnologies (Cambridge, UK) were initially tested using bulked DNA from five to seven individuals. Eighty four primers producing polymorphic patterns were retained, and then tested for their reproducibility by at least two amplifications for 24 samples. Finally, only 36 primers producing scorable and reproducible fragments were used to amplify each of the 93 DNA samples. Each amplification reaction (15 µl) contained 1x reaction buffer, 200 µM of dNTPs, 3 mM of MgCl₂, 0.4 µM of primer, 12.5 ng of genomic DNA template and 0.4 units of *Taq* DNA polymerase (Gibco, BRL). The reaction mixtures were overlaid with mineral oil. Amplifications were carried out in 96-well plates using a MJ Research thermal cycler (PTC-100) with the following programme: 3 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 36°C, 2 min at 72°C. The amplification ended by a final step of 10 min at 72°C. Reaction products (10 µl) were separated by electrophoresis at 5V.cm⁻¹ through 1.3% agarose gels for 4 h in 0.5x TBE buffer (Tris base 0.045 M, Boric acid 0.045 M and EDTA 1 mM) and stained for 30 min in ethidium bromide (0.5 µg.ml⁻¹). Gels were photographed under UV light.

Table 2: Average value and standard deviation for each measured trait in the total area (Total, N= 426), the Baltico-Nordic (BN, N = 116), the Hercyno-Carpathian (HC, N = 154) and the Alpine (A, N = 156) domains.

	<u>Mortality rate*</u>	<u>Height</u> (cm)	<u>Girth</u> (cm)	<u>Pilodyn</u> (mm)	<u>Bud burst</u> (days)
Total	0.02 ± 0.96	472.4 ± 71.9	31.9 ± 5.0	17.3 ± 1.1	23.0 ± 4.2
BN	0.53 ± 1.21	405.1 ± 79.1	26.8 ± 4.8	16.5 ± 1.3	22.7 ± 6.1
HC	-0.14 ± 0.76	518.8 ± 45.2	35.3 ± 3.4	17.9 ± 0.9	24.1 ± 2.9
A	-0.20 ± 0.76	476.6 ± 44.0	32.2 ± 3.6	17.4 ± 0.9	22.0 ± 3.4

*averaged mortality rate computed from normalised provenances mortality rates

Table 3: Fisher's F value (geographical effects) estimated by one-way or nested ANOVA.

	df	Mortality	Height	Girth	<i>Pilodyn</i>	Bud burst
F Domain / Reg	2	19.64***	38.15***	76.18***	35.05***	2.54 <i>ns</i>
F Region / Prov.	72	1.37 <i>ns</i>	7.64***	3.10***	1.99***	11.98***
Residuals MS	351	0.771	1477	1020	0.871	6.024
Explanation part		55%	87%	82%	67%	85%

df = degree of freedom ; MS = Mean Squares ; Significance: *P* *** < 0.01%, *P* ** < 0.1%, *P*ns = non significant

Table 4: Between-trait correlations within the Total area (N = 426).

	Mortality	Height	Girth	Pilodyn	Bud burst	Latitude	Longitude
Height	-0.37***						
Girth	-0.32***	0.79***					
<i>Pilodyn</i>	-0.24***	0.55***	0.65***				
Bud burst	-0.17**	0.26***	0.15*	0.24***			
Latitude	0.37***	-0.58***	-0.54***	-0.42***	-0.23***		
Longitude	0.27***	-0.16**	-0.25***	-0.09 _{ns}	0.31***	0.45***	
Altitude	-0.23***	0.21***	0.26***	0.18**	0.00 _{ns}	-0.78***	-0.46***

Significance: $P^{***} < 0.01\%$, $P^{**} < 0.1\%$, $P^* < 1\%$, P_{ns} = non significant.

Table 5: Between-trait correlations within the Baltico-Nordic (BN, N = 116), the Hercyno-Carpathian (HC, N = 154) and the Alpine (A, N = 156) domains.

	Mortality			Height			Girth			<i>Pilodyn</i>			Bud burst		
	BN	HC	A	BN	HC	A	BN	HC	A	BN	HC	A	BN	HC	A
Height	-0.44***	-0.05 _{ns}	-0.10 _{ns}												
Girth	-0.37***	0.09 _{ns}	-0.20 _{ns}	0.65***	0.63***	0.65***									
<i>Pilodyn</i>	-0.25*	0.06 _{ns}	-0.12 _{ns}	0.38***	0.36***	0.36***	0.49***	0.53***	0.54***						
Bud burst	-0.27*	-0.21*	0.05 _{ns}	0.55***	0.02 _{ns}	-0.30**	0.38***	-0.18 _{ns}	-0.09 _{ns}	0.41***	-0.01 _{ns}	0.04 _{ns}			
Latitude	0.32**	0.11 _{ns}	-0.09 _{ns}	-0.81***	0.32***	0.49***	-0.54***	0.39***	0.26**	-0.45***	0.17 _{ns}	0.19 _{ns}	-0.80***	-0.15 _{ns}	-0.24*
Longitude	0.15 _{ns}	0.03 _{ns}	0.08 _{ns}	0.21 _{ns}	-0.01 _{ns}	0.12 _{ns}	0.00 _{ns}	-0.08 _{ns}	0.13 _{ns}	0.19 _{ns}	0.14 _{ns}	0.04 _{ns}	0.50***	0.47***	-0.29**
Altitude	0.00 _{ns}	0.09 _{ns}	0.00 _{ns}	-0.20 _{ns}	-0.42***	-0.38***	-0.13 _{ns}	-0.30***	-0.28**	-0.16 _{ns}	-0.17 _{ns}	-0.16 _{ns}	0.07 _{ns}	-0.08 _{ns}	-0.13 _{ns}

Significance: $P^{***} < 0.01\%$, $P^{**} < 0.1\%$, $P^* < 1\%$, P_{ns} = non significant.

Table 6: Distribution of the 75 regions among the 3 main branches resolved by the dendrogram computed from phenotypical data. (BN: Baltico-Nordic, HC: Hercyno-Carpathian, A: Alpine). In bold, figures the number of intrusive regions among each group.

Branches	BN	HC	A	Origin and label of intrusive regions
1	19	0	3	French Alps (1, 2), Bulgaria (56)
2	0	17	2	German Alps (22, 35)
3	5	12	17	Russia (75, 80), northern Poland (68, 69, 70)
Total	24	29	22	

Table 7: Correlations between the 426 provenances co-ordinates on principal components and quantitative traits (active data) or geographical parameters (passive data).

	Axis 1 (53%)	Axis 2 (18%)	Axis 3 (16 %)
Mortality rate	-0.54***	-0.15*	0.82***
Height	0.88***	-0.12ns	0.04ns
Girth	0.89***	-0.28***	0.11ns
<i>Pilodyn</i>	0.79***	-0.11ns	0.28***
Bud burst	0.40***	0.89***	0.21***
Latitude	-0.61***	0.00ns	0.07ns
Longitude	-0.17**	0.36***	0.28***
Altitude	0.25***	-0.16**	-0.14*

Significance: $P^{***} < 0.01\%$, $P^{**} < 0.1\%$, $P^* < 1\%$, P_{ns} = non significant.

Data analysis - Clear and polymorphic fragments were scored independently as present (1) or absent (0) and a binary data matrix was constructed. Fragment frequencies were calculated for each domain and a Fisher exact test was applied.

The diversity within each domain was estimated with the Shannon's index (King & Schaal 1989). This phenotypic diversity was first calculated for each locus i : $h'_i = -\pi \sum \log_2 \pi$, where π is the phenotypic frequency and then, averaged across loci: $H' = (1/L) * \sum h'_i$, where L is the number of loci. H_{pop}/H_{sp} and $(H_{pop}-H_{sp})/H_{sp}$ are the partitioning of the domain diversity into within and between components, H_{pop} providing a measure of the average diversity within domain and H_{sp} a measure of the diversity within species. An analysis of molecular variance was also performed on a matrix of squared standard Euclidean distances (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) in order to obtain another estimate of the differentiation among domains (Φ_{st}). Significance was obtained using 500 permutations.

The genetic structure was depicted on 93 trees with 156 fragments by two methods. The first one was a UPGMA cluster analysis based on Jaccard's distances (Jaccard 1908). The second one, was a factorial correspondence analysis (FCA) based on the Chi-2 distances and especially adapted for qualitative data. UPGMA cluster analysis and FCA were performed using the ADE-4 programme (Thioulouse 1997).

III. Results

III. 1. Quantitative traits variation

III. 1. 1. General characteristics and environmental effects

The random distribution of provenances among the 11 subexperiments was confirmed by means of variance analysis using geographical levels (domain and region) and subexperiment as factors. As a consequence, individual data could be directly adjusted to subexperiment effects.

Mortality rate for the 1100 provenances reached a total of 11% at tree age of 16. At this age, the average total height was 472.4 cm (Table 2) and annual length growth reached only 50 cm per year. This indicated low site fertility confirmed by small girth and average core increment estimated at only 3.7 mm per ring. Wood density was higher than usual (17.2 mm of pin penetration instead of 20 mm), denoting good timber quality, partly explained by the observed low growth. Environmental effects, such as subexperiment or block, were significant at 0.1 % level for each trait, due to soil heterogeneity. So, in the most hydromorphic parts of the stand, mortality rate was the highest and growth the lowest.

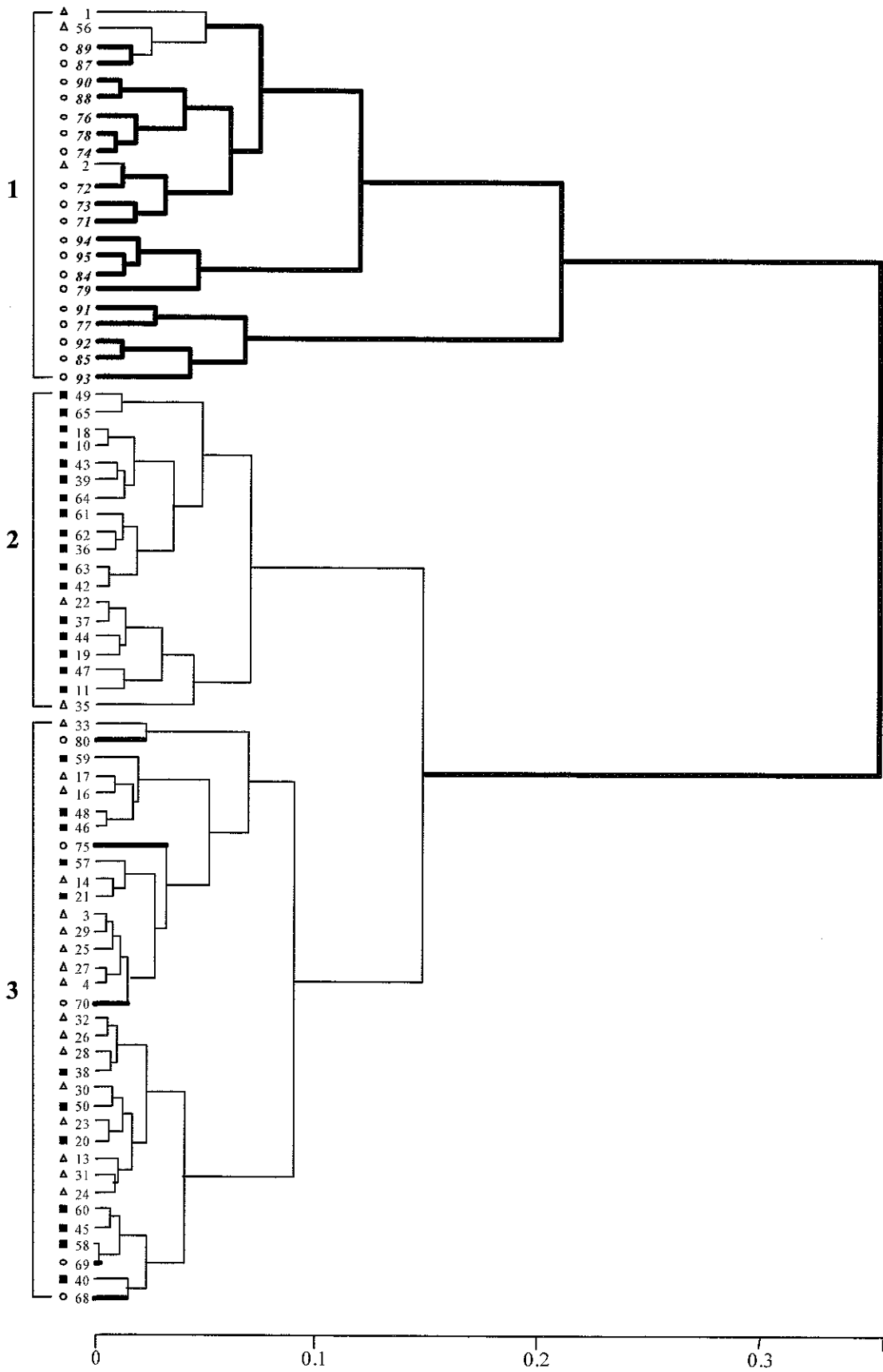


Figure 2: Cluster analysis based on quantitative traits of Norway spruce provenances sampled in 75 regions (corresponding to 3 domains). Domain symbols and region numbers are successively indicated for each 75 OTUs. (○ Baltico-Nordic domain, ■ Hercyno-Carpathian domain, Δ Alpine domain)

III. 1. 2. Geographical effects

In the following parts of the analysis of quantitative traits variation, the expression “provenance” will refer to averaged individual data adjusted to environmental effects as described in materials and methods, and only concerns the 426 retained provenances. For all studied traits, provenance effect was significant at 0.1% level. Geographical effects explained from 55% of the observed variability for mortality up to 85% for total height and bud burst.

Important effects of regions and domains were also observed (Table 3). However, the hierarchical analysis of variance (nested ANOVA) revealed exceptions: the region effect was not significant for mortality and the domain effect not for bud burst. Concerning the between-domain differences (Table 2), the Baltico-Nordic domain exhibited the highest mortality rate and the lowest height and girth, while the Hercyno-Carpathian provenances showed the greatest growth capacity and the lowest mortality rate. The standard deviation revealed a greater variability within the Baltico-Nordic domain compared with the Hercyno-Carpathian and Alpine domains.

Examination of relationships between traits (Table 4) showed that the increase in volumetric proportion (height and girth) was related to a decrease in wood quality (high *Pilodyn* value) and a low mortality rate. This provenance ideotype was found at low latitude and longitude. Bud burst presented weak correlations with other traits. Within each domain (Table 5), relationships were mainly concerned by growth and wood quality (*Pilodyn*). Correlations with mortality were only observed in the Baltico-Nordic domain, while no relationships was found with bud burst in the Hercyno-Carpathian domain. Latitude was linked with quantitative traits, negatively in the Baltico-Nordic domain, positively in the two others. Variations due to altitude were only found for growth traits and in mountainous domains (Hercyno-Carpathian and Alpine). Longitude was only related to bud burst.

The strong correlation observed between altitude and latitude at the total area level and within both the Hercyno-Carpathian and Alpine domains must be referred to the altitude average which increases from the Baltico-Nordic domain (148 m) to the Hercyno-Carpathian (658 m) and Alpine domains (947 m). These changes from a domain to another suggested that traits are organised according to a geographical structure.

III. 1. 3. Geographical structure

The overall organisation of the 75 regions (426 provenances) according to the five measured traits was analysed using a cluster analysis. The dendrogram was resolved into three main branches (Fig. 2). Discrimination of almost all the Baltico-Nordic regions in the first branch and half of the Hercyno-Carpathian regions in the second branch was clearly revealed (Table 6). The third branch grouped together almost all the Alpine regions and the left half of the Hercyno-Carpathian regions. Remarkably, two regions from the French Alps (regions 1 and 2) and the

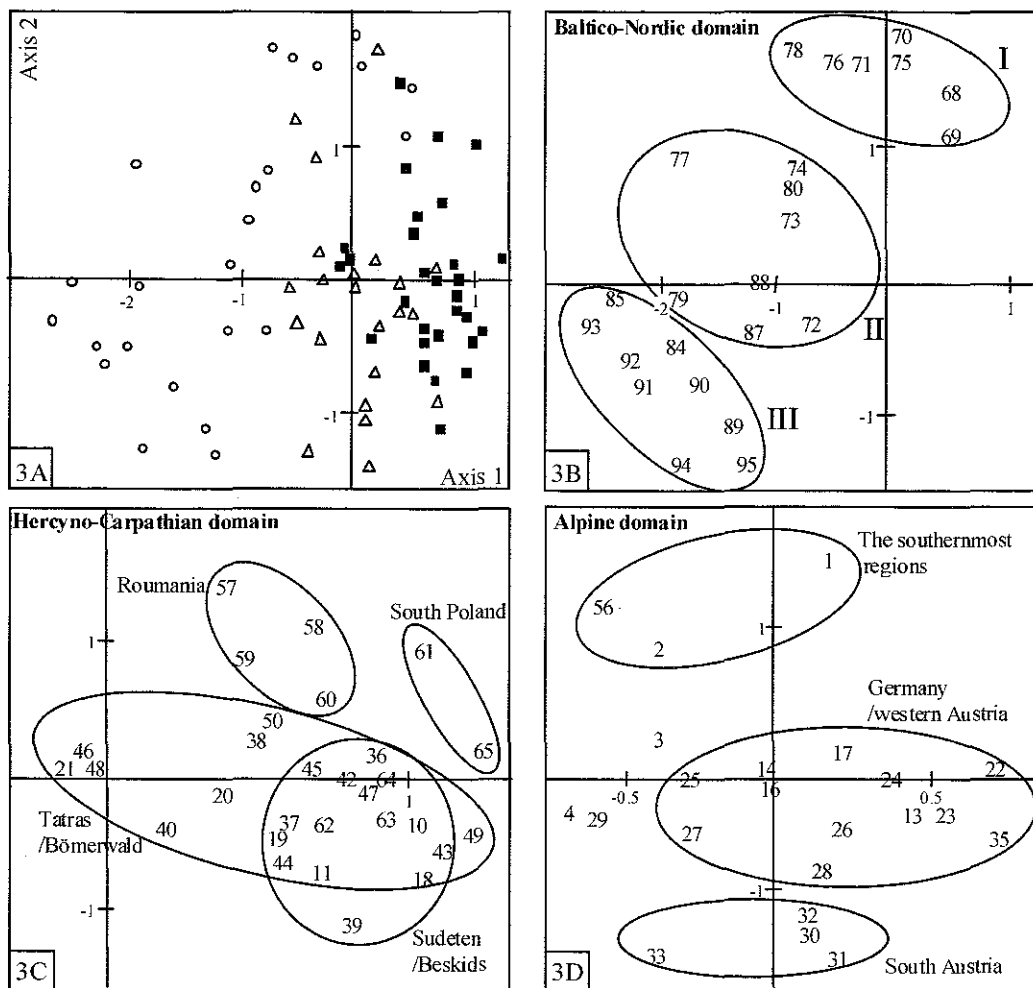


Figure 3: Plane (1,2) of the Principal Components Analysis (PCA) computed from the quantitative traits data. 3A, distribution of the whole 75 regions symbolised according to their original domain. 3B, 3C and 3D, distribution of the regions within each domain. Delineations correspond to homogeneous groups of provenances describe in results (O Baltic-Nordic domain, ■ Hercyno-Carpathian domain, Δ Alpine domain)

unique region from Bulgaria (region 56) were included in the Baltico-Nordic cluster (first branch), whereas five regions from Russia (region 75 and 80) and northern Poland (regions 68, 69 and 70) belonging to the southern part of the Baltico-Nordic domain were found in the third branch. In the second branch, only two Alpine regions from Germany (regions 22 and 35) were closely linked with the Hercyno-Carpathian regions.

The Mantel test between Geographical and Manhattan distances matrix (426x426 provenances) revealed a significant correlation coefficient ($r = 0.53$, $p < 0.01\%$).

The structure of the variability was also analysed using Principal Component Analysis (PCA). Geographical data were only used as passive variables (*i.e.*, only used to interpret the pattern). The two first components explained 71 % of the whole variability. As indicated by the correlations between traits and axes (Table 7), the first three principal components mainly described growth, bud burst, then mortality rate and *Pilodyn*, respectively. Relationships with geographical co-ordinates were significant between axis 1 (growth) and latitude and altitude, and between axis 2 (bud burst) and longitude. The nested ANOVA of provenances component values showed that the best discrimination was obtained with the two first principal components for which geographical levels explained 86 and 80 % of the provenance variability observed on each axis, respectively. The growth axis discriminated domains ($F=50.5^{***}$) whereas bud burst axis separated regions ($F=7.83^{***}$).

To illustrate the structure of the natural variability, the relative position of regions (average of provenances component values) has been indicated on the two first axes (Fig. 3). Figure 3A showed that the Baltico-Nordic domain (left hand side) was quite separate from the others. The Alpine and Hercyno-Carpathian domains partly overlapped.

Detailed pictures for each domain are given in Fig. 3B, 3C and 3D. In the Baltico-Nordic domain (Fig. 3B), three groups congruent with latitudinal variation were clearly observed. The first one (upper part of the plane) included north-eastern Poland (regions 68-70), Lithuania (region 71), Belorussia (region 75) and the southern Moscow area (regions 76 and 78). The second group (intermediate part of the plane) was composed of south Sweden (regions 87 and 88), Lettonia (regions 72 and 73), and the northern Moscow area (regions 74, 77, 79 and 80). The last group comprised all the northern Scandinavian regions (regions 84-85 and 89-95). As already observed in the dendrogram, north-eastern Poland (region 68-70) and Rumanian provenances (regions 57-59) belonging to Hercyno-Carpathian domain were very close. Within the Hercyno-Carpathian domain (Fig. 3C), southern Poland and Rumania regions were well separated. Sudeten, Beskids, Tatras in Slovakia and Böhmerwald in Germany gathered together in the centre part. Within the Alpine domain (Fig. 3D), provenances from southern Germany and western Austria overlapped in the central part of the plane. Southern Austrian provenances were located in the lower part of the plane and French material in the upper part. The southernmost regions (regions 1 and 2 from France and region 56 from south Bulgaria) were closely located to the Baltico-Nordic domain in both PCA (Fig. 3A) and cluster analysis (Fig. 2, first branch).

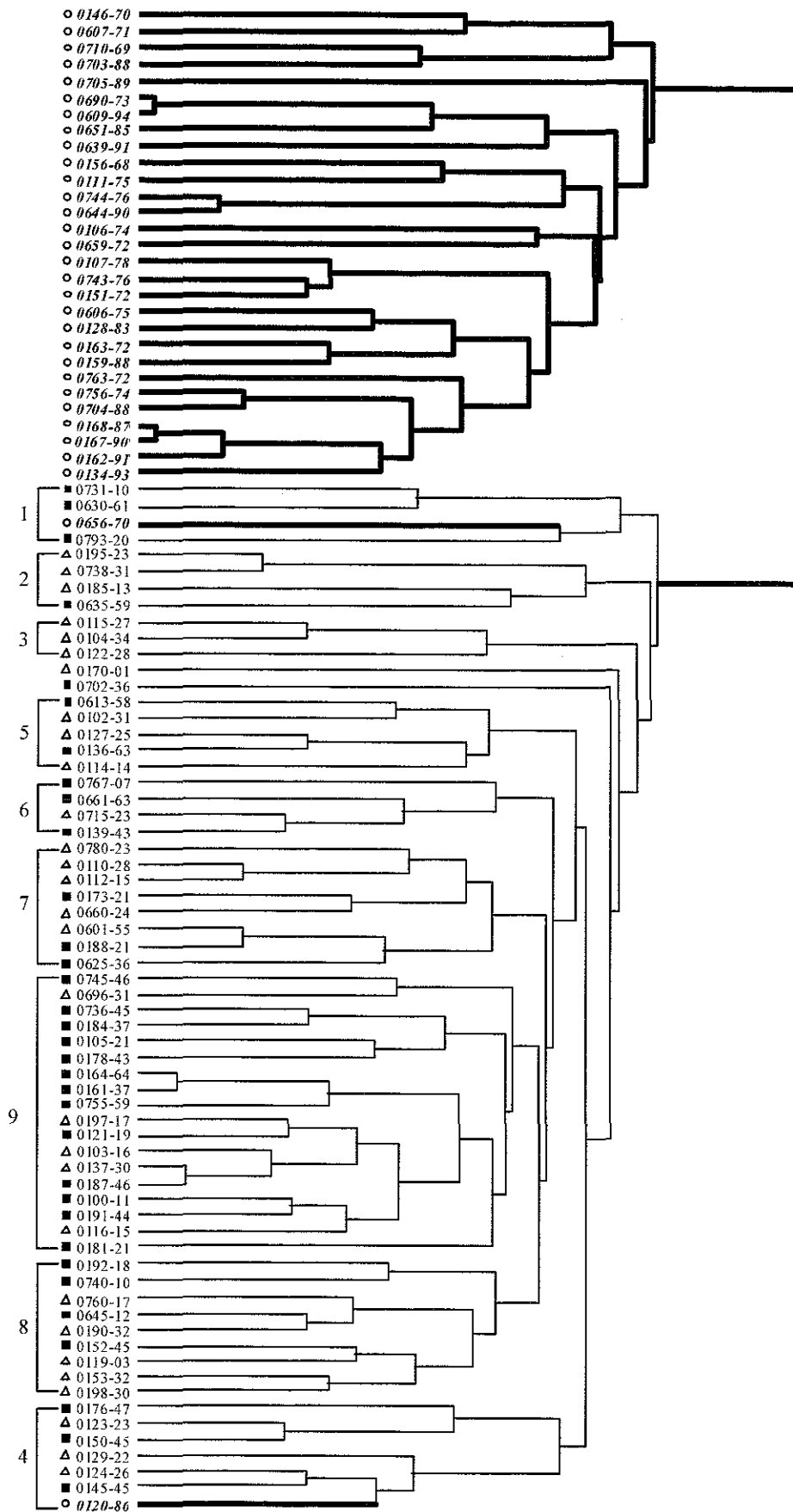


Figure 4: UPGMA cluster analysis based on RAPD data (156 fragments) from 93 trees covering the whole area. Domain symbols, tree codes and region numbers (see Table 1) are successively indicated for each of the 93 OTUs. (O Baltico-Nordic domain, ■ Hercyno-Carpathian domain, Δ Alpine domain)

Table 8: Number of fragments with significant differences between each pairwise combination of domains, and between one domain and the two others (in bold). BN: Baltico-Nordic, HC: Hercyno-Carpathian, A: Alpine.

	BN	HC	A
BN	36		
HC	56	13	
A	62	27	8

Table 9: Distribution of the 75 regions among the 3 main groups resolved by the dendrogram computed from phenotypical data. (BN: Baltico-Nordic, HC: Hercyno-Carpathian, A: Alpine). In bold, figures the number of intrusive trees among each group.

Groups	Sub-groups	BN	HC	A	Origin and label of intrusive regions
I		29	0	0	-
II	9	0	13	5	-
	2+3	0	1	6	0635 (Roumania)
	Others	2	19	18	0656 (North-Poland) ; 0120 (Sweden)
Total		31	33	29	

Table 10: Correlations between the co-ordinates on the two principal axes of FCA computed from the RAPD fragments (active traits) and the geographical parameters or morphological traits (passive traits), within the two groups revealed on the FCA plane : the Baltico-Nordic (BN, N=31) and the central Europe (HC/A, N=62) groups. Correlations were also given for the Hercyno-Carpathian (HC, N=33) and the Alpine (A, N=29) domains.

	Axis 1				Axis 2			
	BN	HC/A	HC	A	BN	HC/A	HC	A
Latitude	-0.55**	-0.04ns	0.24ns	0.20ns	-0.31ns	-0.02ns	0.05ns	-0.36*
Longitude	0.11ns	-0.35**	-0.39*	0.02ns	0.28ns	0.35**	0.29ns	0.43*
Altitude	-0.12ns	-0.09ns	-0.44**	0.00ns	0.16ns	0.00ns	-0.38*	0.42*
Bud burst	0.39*	-0.35**	-0.27ns	-0.39*	0.25ns	-0.10ns	-0.03ns	-0.19ns
Total height	0.42*	0.05ns	0.08ns	0.34ns	0.23ns	0.27*	0.57**	-0.17ns
Girth	0.50**	0.12ns	0.23ns	0.31ns	0.18ns	0.21ns	0.46**	-0.10ns
<i>Pilodyn</i>	0.19ns	0.09ns	0.18ns	0.23ns	0.29ns	0.06ns	0.52**	-0.38*

Significance: $P^{**} < 1\%$, $P^* < 5\%$, Pns= non significant.

III. 2. RAPD variation : general pattern and relationship with morphological variation

III. 2. 1. Fragments polymorphism

The 36 selected primers produced a total of 156 polymorphic RAPD fragments. The frequencies of 85 fragments were found to be significantly different in at least two of the three domains (Table 8). Within domain, Baltico-Nordic domain exhibited numerous fragments with specific frequencies in regard to the two other domains. Between domains, Baltico-Nordic domain was quite different from Alpine and Hercyno-Carpathian domains (62 and 56 fragments with frequencies significantly different) while these latter were fairly closed (27 fragments).

III. 2. 2. Diversity

The Shannon's diversity index was higher in the Baltico-Nordic domain ($H' = 0.704$) than in the Hercyno-Carpathian and Alpine domains. Comparison of diversity estimates within domain ($H_{pop} = 0.685$) and within species ($H_{sp} = 0.748$) indicated that 8.4% of the total variation occurred between domains. This quite high measure of genetic differentiation was further supported by the AMOVA analysis ($\Phi_{st} = 9.9\%$).

III. 2. 3. Geographical structure

Cluster analysis - The genetic relationships among the 93 provenances are shown in Fig 4. The dendrogram was clearly resolved into two major groups of trees (Table 9). The first group consisted of almost all trees from the Baltico-Nordic domain (27 out of 29 trees). The two remaining Baltico-Nordic trees were found in the second group, which was composed of the central Europe trees. This surprising clustering could be explain by their geographical location. The first one (tree 0120) was located outside of the natural area of *Picea abies* in southern Sweden and the second one (tree 0656) originated from eastern Poland (i.e., the southern limit of the Baltico-Nordic domain).

The second group could be divided into 9 heterogeneous sub-groups, but some distinct clusters consistent with geographical origin could be discerned. The sub-group 1 contained trees from eastern Europe (Poland, Czech republic and Rumania). The sub-groups 2 and 3 mainly consisted of Alpine trees, except for the Rumanian tree 0635, probably non-native. The sub-group 9, which was the most important involved 72% of the Hercyno-Carpathian trees. The others were equally composed of trees belonging to the Alpine and Hercyno-Carpathian domains.

Main clusters were consistent with geographical position of trees. This observation was confirmed using a Mantel test between geographical and RAPD distances matrix ($r = 0.52$, $p < 0.01\%$).

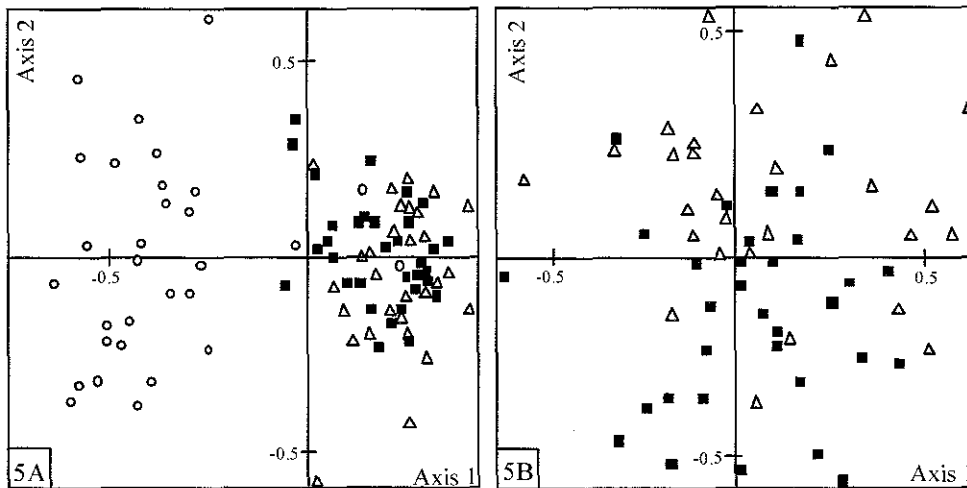


Figure 5: Plane (1,2) of the Factorial Correspondence Analyses (FCA) computed from the RAPD data. 5A, distribution of the whole 93 trees. 5B, distribution of the 62 central Europe trees (Hercyno-Carpathian and Alpine domains). (O Baltico-Nordic domain, ■ Hercyno-Carpathian domain, Δ Alpine domain)

Remarkably, a good concordance between the general patterns of clustering inferred from RAPD (Fig. 4) and quantitative data (Fig. 2) was observed. Indeed, the Baltico-Nordic domain was clearly separated in the two analyses. However, it should be remembered that quantitative traits analysis was conducted from 426 provenances instead of 93 for RAPD analysis. When reduced to these 93 provenances, quantitative traits analysis was less informative: (i) the Mantel test computed between the Manhattan distances matrix resulting from these 93 provenances and the corresponding geographical distances matrix revealed a correlation coefficient lower than that obtained from the 426 provenances (0.36 vs 0.53); (ii) the Baltico-Nordic domain appeared to be mixed with half of the Alpine provenances in both cluster and PCA analyses (data not shown). Besides, the Mantel's correlation coefficient between the two types of matrix distances (Nei's distance for RAPD and Manhattan's distance for quantitative traits analyses) computed from the 93 provenances was low ($r = 0.20$, $p < 5\%$).

Factorial Correspondence Analysis (FCA) - A first FCA was carried out at the whole distribution area level including 93 trees from the three domains (Fig. 5A). Axes 1 and 2 accounted for 10% of the total variation. A clear separation of the Baltico-Nordic trees was revealed along the first axis as already observed in the UPGMA cluster analysis. This group exhibited the widest range of variability occupying the left part of the factorial plane (i.e. characterised by negative values on the first axis). In contrast, the trees from the Hercyno-Carpathian and Alpine domains formed a more compact group on the right part of the plane.

Correlation coefficients between the co-ordinates of each tree on the two first axes of the FCA and both the geographical parameters (latitude, longitude, altitude) and quantitative traits measured in field test (bud burst, growth parameters and *Pilodyn*) are shown in Table 10. A striking geographical structuring was revealed. Considering the Baltico-Nordic group, only a high latitudinal genetic structure was found along axis 1, whereas in the central Europe group longitudinal variation pattern prevailed along both axes 1 and 2. When each central Europe domain was considered separately, structuring of the RAPD variation was different. Within the Hercyno-Carpathian domain, a high altitudinal gradient along axis 1 associated with a lower longitudinal gradient along axes 1 and 2 was revealed. Within the Alpine domain, geographical structuring was lower and concerned latitude, longitude and altitude and axis 2.

In addition to the clear geographical structuring, significant correlations between RAPD variation and the quantitative traits were evidenced. Growth parameters were positively correlated with axis 1 within the Baltico-Nordic and Hercyno-Carpathian domains (axis 2). Within the Alpine domain, quantitative traits lacked to show correlation with RAPD variation except for bud burst (axis 1) or *Pilodyn* (axis 2).

In order to specify the relationships between the Hercyno-Carpathian and Alpine domains, a second FCA, involving only trees from these two domains was performed. The first 3 axes accounted for similar percentage of the total variation (4.4%, 4.1% and 4.0%, respectively). The scatter plot of the two first axes is shown in Fig. 5B. A partial separation between trees of the

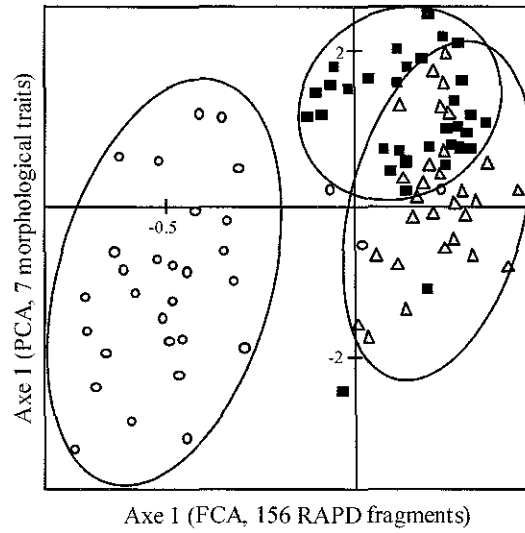


Figure 6: Scatter plot of the first principal components of 93 provenances calculated from quantitative traits and RAPD fragments. (O Baltico-Nordic domain, ■ Hercyno-Carpathian domain, Δ Alpine domain)

two domains was obtained along axis 2 where 83% of the Alpine trees were located in the upper part of the figure, and 73% of the Hercyno-Carpathian trees were found in the lower part. This axis was only correlated with latitude ($r = -0.31$, $p < 1\%$). Similarly, a geographical structuring (longitudinal gradient, $r = -0.47$, $p < 0.1\%$) was revealed with axis 3, which was correlated with height ($r = -0.28$, $p < 5\%$). Within each domain, situations were contrasted. As already observed in the first FCA, genetic structuring was observed within the Hercyno-Carpathian domain for both geographical parameters such as longitude ($r = -0.52$, $p < 1\%$, axis 3) and altitude ($r = -0.55$, $p < 1\%$, axis 1), and quantitative traits such as height ($r = -0.42$, $p < 5\%$, axis 3), girth ($r = 0.45$, $p < 1\%$, axis 1) and *Pilodyn* ($r = -0.41$, $p < 5\%$, axis 3). In the Alpine domain only correlation between axis 3 and *Pilodyn* ($r = -0.40$, $p < 5\%$, axis 1) was apparent.

Multivariate patterns computed from both morphological (PCA) or RAPD data (FCA) were congruent with genetic differentiation of Baltico-Nordic provenances. However, RAPDs appeared to be more informative as indicated by the higher correlations between the first axes and geographical parameters such as latitude, longitude and altitude (Table 7 vs Table 10).

The concordance between morphological and RAPD data has been tested using the 93 provenances for which the two sets of data were available. Correlation between the axes 1 (Fig. 6) computed from RAPD (FCA) and morphological (PCA) data was high ($r = 0.56$, $p < 0.01\%$), contrasting markedly with the low correlation obtained from distances matrices ($r = 0.20$, $p < 5\%$). This correlation was mainly attributable to the Baltico-Nordic provenances. Indeed, using the PCA and FCA axes obtained from the 62 Hercyno-Carpathian and Alpine provenances (data not shown), complete lack of correlation was found ($r \approx 0$).

Moreover, when morphological and RAPD data were combined (Fig. 6), the discrimination between Hercyno-Carpathian and Alpine domains was improved. Only the German provenances remained scattered on the right part of the plane without distinction of native domain (Hercyno-Carpathian and Alpine).

IV. Discussion

IV. 1. Geographical structure of variation in Norway spruce

Spatially and genetically fragmented natural area rarely occur in conifers (Ledig 1986). However in Norway spruce, both quantitative traits and RAPD data sets allowed to easily discriminate between Baltico-Nordic and central Europe provenances. This dual genetic structure was also clearly revealed by allozyme studies (Lagercrantz & Ryman 1990) and is consistent with the postglacial history of the species as inferred from pollen data (Huntley & Birks 1983). Indeed the late-glacial fossil pollen maps suggest westward recolonization from three distinct refugial areas located (1) in western Russia around Moscow (2) at the foot of the Carpathians and (3) in eastern part of the Alps. Compared to other important European trees (Taberlet *et al.* 1998) which were confined to southern refugia during the last glaciation (Spain,

Italy, Balkans), the eastern location of the *Picea abies* refuges is atypical and probably related to its adaptability for cold climate conditions.

Within the Baltico-Nordic domain, quantitative traits and RAPD variations are strongly structured along latitudinal gradient but failed to show any significant correlation with longitude (except for bud burst). Considering the general east-west migration starting 5000 years ago (Huntley & Birks 1983), the lack of longitudinal structure is clearly unexpected. However, recent subfossil wood fragments discovery firmly demonstrates that spruce grew in the Scandes Mountains of Sweden as early as 8000 BP (Kullman 1996). Such relic minor stands or solitary trees may have contributed to the relatively late but rapid (500 m.yr^{-1}) expansion of the species that occurred in Scandinavia between 4000 to 500 BP. As proposed by MacDonald *et al.* (1993) for the recolonization of Canada by *Picea mariana*, such scattered trees that could produce rapidly viable seeds, possibly provided ideal expansion foci promoting fast response when climatic warming favourably changed environmental conditions. The current geographical structure of the genetic variation in the Baltico-Nordic domain might therefore have been confused by relic trees contributions.

In this regard, the marked latitudinal gradient is more likely to relate to ancient events preceding the last expansion. Indeed, quantitative traits and RAPD discrimination between southern (Poland, Bielorussia, south Russia) and northern provenances (Scandinavia, Baltic states, north Russia) within the Baltico-Nordic domain could be explained by an early genetic differentiation within fragmented refugial area (i.e. Moscow area), combined with subsequent spreading towards either the Norwegian coast via a northern way, or the north-eastern Poland via a southern way, as proposed from pollen data (Schmidt-Vogt 1986). In addition, this latitudinal expression of the initial genetic structure could have been reinforced by environmental pressure. As suggested by the significant correlation with bud burst, *Picea abies* has had to adapt to considerable differences in annual amplitude of photoperiodism (up to 8 h, Hallé 1993) and temperature (up to 20°C) due to high latitudinal range (55°N to 65°N). Photoperiodic ecotypes of *Picea abies* have already been evidenced in Norway (Heide 1974) and, for example, cold resistance increasing with latitude in Sweden has been described for *Pinus sylvestris* (Langlet 1959).

Reduced level of quantitative traits variability and molecular phenotype diversity was found in central Europe compared to the Baltico-Nordic domain. This genetic paucity of central Europe domains was also clearly revealed by Lagercrantz and Ryman (1990) using allozyme loci and these authors invoked drastic restriction in population size during retreat towards refuges. Nevertheless, correlation between quantitative traits or molecular variation and longitude in central Europe is consistent with east-west migration from refugial areas located (1) at the foot of the Carpathians and Transylvanian Alps in Rumania and (2) around the Dinaric Alps in ex-Yugoslavia (Schmidt-Vogt 1986). The close relationships between quantitative traits among

French, southern Austria and Balkanic regions on one hand, and Rumania and middle Poland regions on the other hand, are in good accordance with the two proposed refugial areas.

The usual division of central Europe area into distinct Hercyno-Carpathian and Alpine domains is not fully supported by our data which concluded to only weak differentiation. This could be explained by repeated and ancient anthropic actions. Norway spruce has been largely manipulated in the last centuries and the human impact could have dramatically influenced the actual distribution of the variability (Ledig 1992). In this regard, the huge variability of german provenances compared to the other central Europe provenances is dubious and an artificial origin of these populations cannot be completely excluded (Schmidt-Vogt 1976; Konnert 1991). Beyond this low global differentiation, some differences have been obviously evidenced between the two central Europe domains. Both molecular and quantitative traits variations were correlated with longitude within the Hercyno-Carpathian domain, while they appeared to be decoupled within the Alpine domain (correlated with longitude and latitude, respectively). This strongly suggests that recolonisation of Alpine domain progressed in a variety of ways, possibly in relation to its geomorphological complexity (multitude of valleys). Another explanation is the possible influence of additional refuges. Indeed, minor pollen peaks in Italian Apennines which have been for a long time disregarded, probably reveal the occurrence of a secondary refuge responsible for the spreading of spruce in the most southern European countries (Giacomini 1958; Giannini *et al.* 1991). The good quantitative traits characterisation of the southern French provenances can therefore relate to this putative refuge via migration of spruce along the Mediterranean coast, as already observed for *Abies alba* (Konnert & Bergmann 1995) and other European forest trees (Taberlet *et al.* 1998). Such hypothesis has also been supported by RAPD variation among French provenances (Collignon & Favre, 2000).

IV. 2. Quantitative traits vs RAPD variation

As already observed by Lagercrantz and Ryman (1990), we revealed a good general concordance between quantitative trait and molecular variations (discrimination between Baltico-Nordic and central Europe provenances) but considerable discrepancies in details (relationships within domain). The causes of the disparity between quantitative traits and molecular approaches have been widely discussed at the interspecific level and attributed to procedural problems and/or biological effects (Hillis 1987 ; Sytsma 1990). Concerning possible procedural problems, we cannot rule out that assumption of equal rate of divergence between taxa inherent to the phenetic approaches (such as clustering or PCA) can generate misleading estimates of relationships, especially when using quantitative trait (Sytsma 1990). Indeed, asymmetric rates of quantitative traits evolution between two species are likely to confuse relationships at the DNA level (Sytsma & Smith 1992). Consequently, quantitative traits similarity can mask divergence at the DNA level and vice versa.

However, since variation in quantitative traits rate of divergence can be minimised at intraspecific level, we favour biological factors to explain the observed discrepancies. Quantitative traits are indeed considered to be more prone to variability in evolutionary rate than molecular markers (Lande & Barrowclough 1987 ; Moran *et al.* 1989 ; Gepts 1993) because they generally are subjected to the direct and variable action of natural selection (Strauss *et al.* 1992). Molecular markers, usually neutral or nearly neutral (Nei 1987), are therefore better indices of the length of time that has elapsed since the divergence of infraspecific taxa. In this scheme, disparity between quantitative traits and molecular approaches in *Picea abies* might be related to recent history of postglacial expansion (only 10,000 years). Moreover, occurrence of intensive gene flow within domain (Tigerstedt 1973 ; Muona *et al.* 1990) may confuse phylogeographic patterns.

In contrast, the clear quantitative traits and molecular resolution of *Picea abies* into two large subgroups probably reflects ancient events tracing back to the last glaciations. Such a general concordance is usually reported for plant species with a wide distribution range (Wheeler & Guries 1982 ; Kremer 1994) which are more likely to have been fragmented into different subpopulations during glacial periods. Prolonged reproductive isolation or restricted gene flow between geographically isolated refugial subpopulations can indeed promote pronounced divergence at both quantitative traits and molecular levels via long term effects of mutation, selection and genetic drift (Hartl & Clark 1989). Moreover, possible hybridization between *Picea abies* and *Picea obovata* (Siberian spruce) within the Moscow refugial area (Krutovskii & Bergmann 1995) could have generated new sources of variation at morphological and molecular level contributing to the divergence of Baltico-Nordic provenances. This early differentiation has been maintained during the postglacial expansion probably in relation to geographical separation of northern and central Europe postglacial ways, and can be still currently recognised.

In conclusion, congruence between quantitative traits and DNA variation is strong evidence that the underlying historical pattern has been elucidated (Hillis 1987) and conflict refers to more recent evolution. In this case combinations of quantitative traits and RAPD studies provide complementary insights to highlight geographical structuring.

Remarkably divergence between two groups rarely occurs at the intraspecific level and sometimes remains unclear between different species (Bodénès *et al.* 1997). Therefore, it would be of interest to evaluate natural gene flow between Baltico-Nordic and central Europe domains (especially in the Poland contact zones, Lewandowski *et al.* 1997) in order to discuss the reality of current allopatric speciation process (Arnold 1997) within *Picea abies*.

V. References

- Arnold, M. L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, New York.
Bachmann, K. 1994. Molecular markers in plant ecology. *New Phytol.* **126**: 403-418

- Bartlein, P. J. 1988. Late-tertiary and quaternary paleo-environment. In *Vegetation history*, Huntley, B. and T. Webb III edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Bergmann, F. and H. R. Gregorius. 1979. Comparison of the genetic diversities of various populations of Norway spruce (*Picea abies*). *Proceeding of a conference on biochemical genetics of forest trees*. Umeå Swedish University of Agricultural Sciences. pp 99-107
- Bodénès, C., F. Laigret, S. Joandet and A. Kremer. 1997. Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Heredity* **78**: 433-444
- Bouvarel, P. 1954. Variabilité de l'Épicéa (*Picea excelsa* L.) dans le Jura français. Répartition et caractères des divers types. *Rev. For. Fr.* **2**: 85-98
- Bouvarel, P. and M. Jacamon. 1959. Les Épicéas remarquables du Kertoff. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **106**: 128-130
- Bucci, G. and P. Menozzi. 1993. Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA in *Picea abies* Karst. *Mol. Ecol.* **2**: 227-232
- Collignon, A. M. and Favre J. M. 2000. Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies* natural area using RAPD markers. *Ann. Bot.* **85** : 713-722
- Dhillon, S. S. 1987. DNA in tree species. In *Cell and tissue culture in forestry*, Bonga, J. M. and D. J. Deuzan edn. Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch. Bull.* **19**: 11-15
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491
- Gepts, P. 1993. The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. *Evol. Biol.* **27**: 51-93
- Giacomini, V. 1958. La flora. In: *Conosci l'Italia*, Touring Club Italiano edn. vol. II, Milano.
- Giannini, R., M. Morgante and G. G. Vendramin. 1991. Allozyme Variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genet.* **40**: 160-166
- Hadrys, H., M. Balick and B. Schierwater. 1992. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**: 55-63
- Hallé, F. 1993. Un monde sans hiver. Les tropiques nature et société, Seuil edn. Paris.
- Hartl, D. L. and A. G. Clarck. 1989. *Principles of population Genetics*, 2nd edn. Sinauer, Sunderland, MA.
- Heide, O. M. 1974. Growth and dormancy in Norway spruce Ecotypes (*Picea abies*). I. Interaction of photoperiod and temperature. *Physiol. Plant.* **30**: 1-12
- Hillis, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 23-42
- Huntley, B. 1996. Late-quaternary climate and forest history. *Common. For. Rev.* **75**: 6-11
- Huntley, B. and H. J. B. Birks. 1983. *An atlas of past and present pollen maps for Europe, 0-13,000 years ago*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Natl.* **44**: 223-270

- Karhu, A., P. Hurme, M. Karjalainen, P. Karvonen, K. Kärkkäinen, D. Neale and O. Savolainen. 1996. Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor. Appl. Genet.* **93**: 215-221
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- King, L. M. and B. A. Schaal. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution* **43**: 1117-1119
- Konnert M. 1991. Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald: Genetische Variation und Korrelationen. *Forstwiss. Cbl.* **110**: 84-94
- Konnert, M. and F. Bergmann. 1995. The geographical distribution of genetic variation of Silver fir (*Abies alba*, *Pinaceae*) in relation to its migration history. *Plant Syst. Evol.* **196**: 19-30
- Kremer, A. 1994. Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genet. Sel. Evol.* **26**: 105s-123s
- Krutovskii, K. V. and F. Bergmann. 1995. Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity* **74**: 464-480
- Krutzsch, P. 1974. The IUFRO 1964 / 68 provenances test with Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genet.* **23**: 58-62
- Krutzsch, P. 1992. IUFRO's role in coniferous tree improvement: Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae genet* **41**: 143-150
- Kullman, L. 1996. Norway spruce present in the Scandes mountains, Sweden at 8000 BP: new light on holocene tree spread. *Global Ecol. Biogeogr. Letters* **5**: 94-101
- Lagercrantz, U. and N. Ryman. 1990. Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* **44**: 38-53
- Lande, R. and G. F. Barrowclough. 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: *Viable population for conservation*, Soulé edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Langlet, O. 1959. A cline or not a cline, a question of Scots Pine. *Silvae Genet.* **8**: 13-22
- Ledig, F. T. 1986. Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants. In *Conservation biology*, M.E. Soulé edn. Sinauer, Sunderland, MA.
- Lewandowski, A., J. Burczyk and W. Chalupka. 1997. Preliminary results on allozyme diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Poland based on plus tree investigations. *Act. Soc. Bot. Pol.* **66**: 197-200
- MacDonald, G. M., T. W. D. Edwards, K. A. Moser, R. Pienitz and J. P. Smol. 1993. Rapid response of treeline vegetation and lakes to past climate warming. *Nature.* **361**: 243-246
- Markgraf, V. 1970. Paleohistory of the spruce in Switzerland. *Nature.* **228**: 249-251
- Moran, F. G., O. Muona and J. C. Bell. 1989. *Acacia mangium*: a tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. *Evolution* **43**: 231-235
- Müller-Starck G., P. Baradat and F. Bergmann. 1992. Genetic variation within European tree species. *New For.* **6**: 23-47
- Muona, O., L. Paul, A. E. Szmidt and K. Kärkkäinen. 1990. Mating system analysis in a central and northern European population of *Picea abies*. *Scand. J. For. Res.* **5**: 97-102
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary biology*. Columbia University Press, New York.

- Nevo, E. 1988. Genetic diversity in nature. *Evol. Biol.* **23**: 217-246
- Persson, A. and B. Persson. 1992. Survival, growth and quality of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) provenances at three Swedish sites of the IUFRO 1964/68 provenance experiment. Swedish University of Agricultural Sciences. *Department of Yield Research, Report 29*, 67pp
- Ruffieux, S. 1996. Structuration de la variabilité génétique de l'Epicéa commun. Rapport de stage ESITPA, Orléans.
- Schmidt-Vogt, H. 1976. Fichtenherkünfte (*Picea abies* [L.] Karst.) der Bundesrepublik Deutschland. *Allg. Forst. Jagdztg.* **147**: 149-163
- Schmidt-Vogt, H. 1986. *Die Fichte*. Band II/1. Parey, Hamburg.
- Splus. 1996. Splus reference manual version 3.4 Statistical Sciences Inc., Seattle, Washington.
- Strauss, S. H., J. Bousquet, V. D. Hipkins and Y. P. Hong. 1992. Biochemical and molecular genetic markers in biosystematic studies of forest trees. *New For.* **6**: 125-158
- Sytsma, K. J. 1990. DNA and morphology: inference of plant phylogeny. *Trends Ecol. Evol.* **5**: 104-110
- Sytsma, K. J. and J. F. Smith. 1992. Molecular systematics of Onagraceae: examples from *Clarkia* and *Fuchsia*. In: *Molecular Systematics of plants*, Soltis, P.S., D. E. Soltis and J. J. Doyle edn. Chapman & Hall, New York.
- Taberlet, P., L. Fumagalli, A. G. Wust-Saucy and J. F. Cossons. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* **7**: 453-464
- Thioulouse, J., D. Chessel, S. Dolédec and J. P. Olivier. 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Stat. Comp.* **7**: 75-83
- Tigerstedt, P. M. A. 1973. Studies on isozyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*. *Hereditas.* **75**: 47-60
- Wheeler, N. C., and R. P. Guries. 1982. Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Can. J. For. Res.* **12**: 595-606
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6531-6535

Conclusion

L'examen des variations des caractères quantitatifs et moléculaires conduit à distinguer deux grands groupes génétiquement éloignés au sein de l'aire naturelle de l'Épicéa. Le premier correspond au domaine baltico-nordique. Le second, regroupe les domaines hercyno-carpathique et alpin. Cette différenciation est probablement le résultat des fluctuations climatiques survenues au cours du quaternaire en Europe.

Au cours des 60 000 ans de périodes froides particulièrement rudes, qui se sont écoulées entre 70 000 BP et 13 000 BP, 800 générations environ d'Épicéas se sont succédées. Les populations réfugiées dans la région de Moscou se seraient morphologiquement et physiologiquement adaptées au climat boréal. Sous ces latitudes élevées, où le rayonnement lumineux est réduit, les Épicéas possèdent des aiguilles petites et fines leur permettant de supporter le froid intense ainsi que la sécheresse de l'hiver. Les populations carpathiques et alpines repliées dans des refuges à des latitudes plus faibles en Europe moyenne, ont été soumises à des rayonnements lumineux plus intenses mais surtout plus réguliers. Elles se seraient davantage acclimatées aux fortes précipitations et aux vents caractéristiques des zones montagneuses.

Lorsque le dernier épisode glaciaire a pris fin, il y a environ 18 000 ans, un processus de recolonisation vers l'ouest de l'Europe, s'est engagé à partir de ces diverses zones refuges. Plus de 1500 km séparent le refuge présumé de la région de Moscou des deux autres. Selon toute vraisemblance, les grandes caractéristiques morphologiques et physiologiques acquises pendant les glaciations au sein des refuges montagneux ou boréaux ont été conservées et les populations qui en sont issues présentent aujourd'hui encore des particularités adaptatives très différentes.

Les populations occupant les domaines hercyno-carpathique et alpin sont très peu différenciées au niveau des caractères quantitatifs et moléculaires. Deux hypothèses sont envisageables :

- 1) Lors des glaciations, des contacts entre les refuges d'Europe centrale distants de moins de 600 km ont pu avoir lieu.
- 2) Les conditions climatiques et écologiques de ces zones refuges étaient très proches et même en admettant que les populations qui s'y trouvaient n'aient eu aucun contact pendant toute la période glaciaire, il est fort probable que, soumises à des conditions similaires, elles aient évoluées de façon convergente. Cette seconde hypothèse est toutefois insuffisante pour expliquer la faible différenciation moléculaire. Il faut alors supposer que la proximité des deux domaines ait favorisée un flux de gène important et ceci dès le début du processus de recolonisation.

A l'intérieur des 2 grands groupes ainsi mis en évidence des structurations géographiques apparaissent très clairement :

- Dans le groupe baltico-nordique, contrairement au gradient longitudinal attendu correspondant à la migration est-ouest, un fort gradient nord-sud est détecté. La participation de refuges relictuels en Scandinavie lors du processus de recolonisation ainsi que la présence de

plusieurs refuges principaux dispersés latitudinalement dans la région de Moscou pourraient expliquer en partie ces observations.

- Dans le groupe d'Europe centrale, un gradient longitudinal modéré a été détecté. Ce gradient est cependant moins marqué dans le domaine alpin ce qui indique que la migration est-ouest y a été probablement davantage perturbée.. Ceci est à mettre en relation avec la structure géomorphologique complexe de l'arc alpin et une possible participation, à la recolonisation de ces régions, de populations issues d'un refuge glaciaire supplémentaire localisé dans le sud de l'Europe. Cette dernière hypothèse est en accord avec les travaux de Giannini *et al.* (1991), qui suggèrent l'existence d'un refuge toscan ayant contribué à la recolonisation du versant sud du massif alpin.

Chapitre III : Variation moléculaire de l'Epicéa à l'Ouest de son aire naturelle

Nous avons, dans le chapitre précédent, décrit la variation de *Picea abies* dans l'ensemble de son aire naturelle et plus particulièrement en Europe Centrale. Le dispositif utilisé contient de nombreuses provenances mais très peu d'entre-elles sont issues de la limite ouest de l'aire (15/1100, dont 1 du massif vosgien, 5 du Jura, 9 de la partie nord des Alpes et 1 de la partie sud des Alpes).

Les limites d'aires contiennent généralement des populations ayant une diversité plus faible que les populations en position centrale. Cependant, situées dans des conditions climatiques et écologiques marginales pour l'espèce, elles sont soumises à une forte pression de sélection et présentent des caractères adaptatifs intéressants (écotypes).

Afin d'approfondir l'étude des variations génétiques dans cette zone peu analysée de l'aire, nous avons réalisé un nouvel échantillonnage couvrant l'ensemble des trois massifs français qui abritent des populations naturelles d'Epicéa (Vosges, Jura et Alpes). Ces trois massifs appartiennent au domaine alpin.

Les résultats sont présentés dans l'article intitulé : " Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies* natural area using RAPD markers." paru dans la revue *Annals of Botany* 85 : 713-722

Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies* natural area using RAPD markers

A.M. Collignon and J.M. Favre

Abstract: RAPD analysis was used (i) to assess the diversity of indigenous *Picea abies* within the French massifs (Alps, Jura and Vosges) in comparison with the Hercyno-Carpathian and Alpine domains (central Europe), (ii) to examine the molecular relationships among provenances of these massifs and domains. 137 polymorphic RAPD fragments were screened. Results showed that the phenotypic diversity estimates within the different massifs and domains analysed were similarly high. Factorial correspondence and cluster analyses revealed geographical structuring along latitudinal gradient among the French massifs and longitudinal gradient from eastern Europe to France. The southern French Alps provenances appeared to be genetically distinct from the others. Hypothetical postglacial ways into French massifs are proposed and the putative implication of an additional refuge located in the Tuscan Apennines is discussed.

Key words: *Picea abies*, Norway spruce, phylogeography, phenotypic diversity, correspondence analysis, RAPD.

I. Introduction

In both animal and plant species, the genetic variability observed across the natural distribution area is structured by geographical conditions, ecological factors, mating system and also by historical events such as glacial periods (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997). Usually, the observed variability is lower in marginal populations compared to populations in more central position or located in the vicinity of ancient glacial refuges. Indeed, populations growing at the limits of natural range generally originate from a few founding individuals and thus have only received a subset of the diversity present in central populations. In addition, they often suffer from a reduced and continuous unidirectional gene flow (Tigerstedt, 1973; Mayr, 1970; Taberlet *et al.* 1998).

In forest trees, such a decrease of genetic variability towards the recently colonized regions (species margins) has been reported for the angiosperms *Fagus sylvatica* (Demesure, Comps and Petit, 1996), *F. crenata* (Tomaru *et al.*, 1997) and *Quercus sp.* (Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997), as well as for the gymnosperms *Picea mariana* (Yeh *et al.*, 1986), *Pinus kesiya* (Myburg and

Harris, 1997), *P. monticola* (Steinhoff, Joyce and Fins, 1983), *P. rigida* (Guries and Ledig, 1982) and *Pseudotsuga menziesii* (Li and Adams, 1989). However, in other gymnosperm species such as *Picea glauca* (Tremblay and Simon, 1989), *P. sitchensis* (Yeh and El-Kassaby, 1980), *Pinus contorta* (Wheeler and Guries, 1982), *P. jeffreyi* (Furnier and Adams, 1986), *P. nigra* (Scaltsoyiannes *et al.*, 1994) and *P. sylvestris* (Prus-Glowachi and Stephan, 1994), marginal and central populations were found to maintain similar levels of genetic diversity, possibly in relation to the ecological amplitude and mating system of these species, the lack of effective barriers to prevent gene flow and the small number of generations since the last deglaciation.

The present investigation is concerned with one of the most common forest tree in Europe, *Picea abies* L. Karst. (Norway spruce), at the western limit of its distribution area. Norway spruce occurs throughout Fennoscandia and European Russia (extreme North excluded) as well as along the major mountains of eastern and central Europe.

The natural area of *Picea abies* is usually divided into three major domains, i.e. the Baltico-Nordic, Hercyno-Carpathian and Alpine domains, which are generally considered to be the result of postglacial recolonisation from three putative refuges located in the Moscow area, in the Carpathians and in the Dinaric Alps, respectively (Huntley and Birks, 1983; Schmidt-Vogt, 1986). Morphological and allozyme variations on the whole distribution area have been intensively investigated using IUFRO (International Union of Forestry Research Organizations) provenance-testing programmes (Lagercrantz and Ryman, 1990; Krutzsch, 1992). A clear geographical pattern of genetic variation along a northeastern-southwestern transect was revealed, probably reflecting relatively recent historical events related to the last glaciation in Europe. Moreover, the amount of genetic variation was considerably reduced in central Europe populations, possibly due to drastic restriction of populations size (bottleneck effect) during this glacial period (Lagercrantz and Ryman, 1990; Goncharenko, Zadeika and Birgelis, 1995; Lewandowski, Burczyk and Chalupka, 1997). Comparatively, only a few studies were focused on the marginal populations. In the Baltico-Nordic domain, Tigerstedt (1973) found that genetic diversity was similar in marginal and central populations. In contrast, Italian populations at the southern limit of the natural distribution area appeared to be more variable than the central Europe populations (Lagercrantz and Ryman, 1990; Giannini, Morgante and Vendramin, 1991; Bucci and Menozzi, 1995). In addition, some of them exhibited specific allelic composition suggesting a supplementary glacial refuge in the Tuscan Apennines.

The westernmost autochthonous populations studied to date are situated in Switzerland (20 populations: Müller-Starck, 1995), Germany (1 population of the Black forest: Konnert, 1991) and France (1 population: Lagercrantz and Ryman, 1990). As in southern Europe, high genetic diversity was observed and several populations appeared to contain specific alleles.

French autochthonous populations of *Picea abies* are located at the western limit of the natural distribution area and are restricted to mountainous regions such as Jura, Alps and Vosges. In northern Alps and Jura, vast populations are structured around geomorphologic traits such as

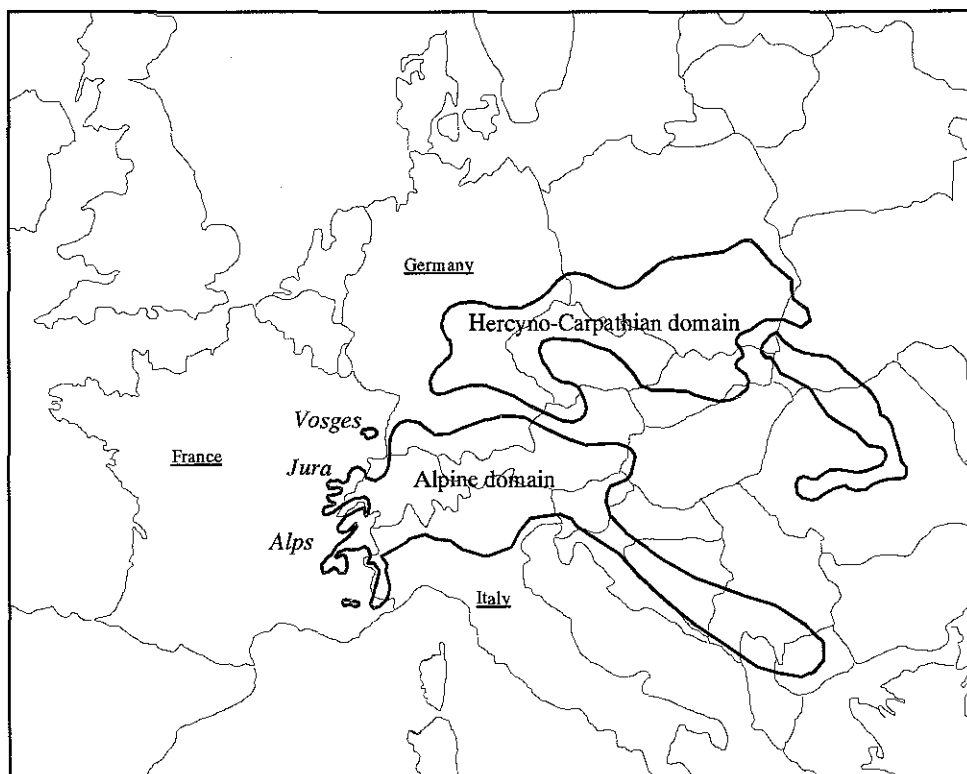


Fig. 1 Geographical location of the three French massifs and the two central Europe domains.

valleys or plateaux. Conversely, the species is distributed into discontinuous fragmented populations in southern Alps and occurs in disseminated small stands in Vosges. Little is known about these French provenances which therefore need further investigations. In this paper we initiated a comprehensive study of the molecular variation among them, using RAPD markers. We first estimated the level of phenotypic diversity within the French massifs (Alps, Jura and Vosges) and, by comparison, within the two central Europe domains (Hercyno-Carpathian and Alpine). Then, we examined the relationships among the French provenances and between the French and the central Europe provenances in order to clarify the postglacial history at the western margin of *Picea abies* distribution area.

II. Materials and Methods

II. 1. Plant Material

RAPD analysis was performed on 90 adult *P. abies* trees from the whole French natural area. Thirty trees (15 populations) were sampled in an effort to cover the three French massifs: Alps, Jura and Vosges (Fig. 1). Material from Jura and Alps was collected in clonal-test (INRA Champenoux, France), while Vosges material was collected in forest. These French trees were compared to 62 trees from both Hercyno-Carpathian (33 trees) and Alpine (29 trees) domains (Fig. 1) previously analysed (Collignon *et al.*, in prep.). These trees were sampled in the international IUFRO provenance test 1964/1968 (Kruttsch, 1992) located in Amance forest (north-east of France). The geographical parameters of sampled trees are given in Table 1.

II. 2. DNA extraction

DNA was isolated from 1 g of needles using the Doyle and Doyle (1987) protocol with 1% 2-mercaptoethanol (v/v) and 1% PVP 40 000 (w/v) added in the CTAB extraction buffer. The extractions were performed using chloroforme-octanol (24:1) instead of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) and the resulting DNA pellet was washed with 70% ethanol before the final suspension step. DNA concentrations were determined by comparison with serial dilution of standard lambda DNA.

II. 3. RAPD analysis

DNA amplification has been performed according to Williams *et al.* (1990). Thirty one random decamer primers obtained from Operon Technologies (Alameda, USA) and Genosys Biotechnologies (Cambridge, UK) were selected among 200 tested for clarity and reproducibility of the pattern produced (Table 2). Each amplification reaction contained 1x reaction buffer (Gibco, BRL), 200 µM each of dNTPs, 3 mM of MgCl₂, 0.4 to 3 µM of primer (Table 2), 12.5 ng of genomic DNA template and 0.4 units of *Taq* DNA polymerase (Gibco, BRL), for a

Table 1 Geographical parameters of sampled individuals.

Tree code	Location	Latitude (N)	Longitude (W)	Tree code	Location	Latitude (N)	Longitude (W)
Vosges (Δ)							
1-2	Gérardmer (FC)	48°06	6°53	17-18	Gérardmer (FD)	48°06	6°52
3-4	Gérardmer (FD)	48°03	6°52	19-20	Gérardmer (FD)	48°04	6°47
5-6	Gérardmer (FD)	48°04	6°58	21-22	Soultzeren (FC)	48°03	7°04
7-8	Gérardmer (FD)	48°05	6°48	23-24	Tholy (FC)	48°03	6°46
9-10	Jurassupt (FC)	48°06	6°48	25-26	Réhaupal (FC)	48°06	6°45
11-12	La Bresse (FC)	48°03	6°57	27-28	Vologne (FD)	48°07	6°51
13-14	Val de Senones (FD)	48°30	7°00	29-30	Haute-Meurthe (FD)	48°07	6°57
15-16	Stosswhir (FC)	48°03	7°02				
Alps (■)							
31-32	Chartreuse (FD)	45°22	5°45	47-48	Chamrousse (FC)	45°06	5°53
33-34	Aussois (FC)	45°45	6°44	49-50	Autrans (FC)	45°10	5°30
35-36	Lantosque (FD)	44°00	7°19	51-52	Verdache (FC)	44°16	6°20
37-38	Morzine (FC)	46°11	6°45	53-54	St-Et.-en-Dévoluy(FC)	44°42	5°56
39-40	Montriond (FC)	46°16	6°44	55-56	Chamonix (FD)	46°00	6°52
41-42	Névache (FC)	45°01	6°34	57-58	Lully (FC)	46°20	6°23
43-44	St Martin Vesubie(FC)	44°04	7°15	59-60	Châtel (FC)	46°16	6°50
45-46	Sées (FC)	45°37	6°49				
Jura (▲)							
61-62	Bonnétage (FC)	47°11	6°45	79-80	Champfromier (FC)	46°13	5°52
63-64	Esserval-Tartre (FC)	46°50	6°05	81-82	Massacre (FC)	46°25	6°03
65-66	Grande-Côte (FC)	46°47	6°15	83-84	Bois D'Amont (FC)	46°29	6°05
67-68	FD de Levier (FD)	46°57	6°04	85-86	Cuvier (FC)	46°50	6°04
69-70	La Fuvelle (FD)	46°27	6°19	87-88	Massif du Risoux	46°29	6°05
71-72	Massacre (FIC)	46°24	6°02	89-90	Risol (FD)	46°39	6°13
73-74	Mignovillard (FC)	46°45	6°12				
75-76	Plan des Cosaques(FC)	46°29	6°06				
77-78	La Joux (FD)	46°49	6°00				
Hercyno-Carpathian domain (○)							
91	Poland	49°5	19°1	108	Slovakia	49°0	19°9
92	Poland	50°5	21°3	109	Slovakia	49°0	18°9
93	Romania	46°7	22°7	110	Slovakia	49°6	18°8
94	Romania	46°9	25°4	111	Slovakia	49°0	20°2
95	Romania	47°8	25°5	112	Slovakia	49°1	19°3
96	Czech Republic	49°8	17°3	113	Germany	50°7	10°7
97	Czech Republic	49°5	13°0	114	Germany	48°9	13°3
98	Czech Republic	50°2	16°5	115	Germany	49°5	12°3
99	Czech Republic	50°3	17°3	116	Germany	48°9	13°3
100	Czech Republic	48°9	13°8	117	Germany	49°1	10°1
101	Czech Republic	49°5	13°6	118	Germany	50°7	13°3
102	Czech Republic	49°5	17°1	119	Germany	48°6	13°4
103	Czech Republic	48°8	14°8	120	Germany	49°1	13°2
104	Czech Republic	50°1	12°3	121	Germany	49°9	8°9
105	Czech Republic	49°2	17°8	122	Germany	51°8	10°8
106	Czech Republic	49°3	18°3	123	Austria	48°6	15°5
107	Czech Republic	49°2	17°8				
Alpine domain (●)							
124	Germany	48°1	10°5	143	Austria	47°2	10°1
125	Germany	48°0	9°7	144	Austria	47°3	13°2
126	Germany	47°8	8°5	145	Austria	47°1	13°8
127	Germany	47°7	12°9	146	Austria	47°6	15°3
128	Germany	47°5	11°1	147	Austria	47°4	15°2
129	Germany	48°1	12°2	148	Austria	47°5	13°9
130	Germany	48°0	8°5	149	Austria	46°8	14°1
131	Germany	48°0	10°2	150	Austria	47°0	14°5
132	Germany	48°3	8°9	151	France	46°8	6°1
133	Germany	48°7	10°3	152	France	44°0	7°3
134	Germany	48°1	10°6				
135	Germany	48°0	9°2				
136	Germany	48°1	10°9				
137	Switzerland	46°5	8°5				
138	Switzerland	46°5	8°8				
139	Serbia	43°9	19°5				
140	Austria	46°8	14°1				
141	Austria	47°6	15°8				
142	Austria	47°0	12°5				

total volume of 15 μ l. The reaction mixtures were overlaid with mineral oil. For each primer, amplification of the 152 DNA samples was carried out in 96-well plates using a MJ Research thermal cycler (PTC-100) with the following programme: 3 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 36°C, 2 min at 72°C and 10 min at 72°C. Reaction products were checked onto 1.3 % agarose gels (2 gels per primer), 20 cm wide and 40 cm long (OWL apparatus). 10 μ l of each reaction product were mixed with 1 μ l loading buffer (50% glycerol, 0.4% bromophenol blue, 0.4% xylene cyanol) and rapidly applied to the middle part (to avoid smiling) of three 42 well-lines (spaced at regular 13 cm intervals) using a multichannel pipette. Two wells per line included a 100 bp DNA ladder (Gibco BRL) as a size marker. Electrophoresis was run at 5 V.cm⁻¹ for 4 h in 0.5 x TBE buffer (45 mM Tris base, 45 mM Boric acid and 1 mM EDTA pH 8.0). The three parts of each gel were stained for 30 min in ethidium bromide (0.5 μ g.ml⁻¹) and photographed under UV light.

II. 4. Data analysis

Only clear and polymorphic fragments were used for data analysis. These fragments were scored independently as present (1) or absent (0) and a binary data matrix was constructed. Fragment frequencies were calculated for each of the massifs and domains studied and a Fisher exact test was applied. Factorial correspondence analysis (FCA) based on the Chi-2 distances and especially adapted for qualitative data (Thioulouse *et al.*, 1997), was used to obtain synthetic pictures of phenotypic molecular variation. An ascendant hierarchical classification (AHC) using the variance aggregation of Ward (1963) and Jaccard's distances (Jaccard, 1908) was also performed to aggregate individuals into major clusters. FCA and AHC analyses were performed using the ADE-4 programme (Thioulouse *et al.*, 1997).

An analysis of molecular variance (AMOVA: Excoffier, Smouse and Quattro, 1992) was performed on a matrix of squared standard euclidean distances. Differentiation among massifs and/or domains and among the French massifs only, were inferred from Φ st value. Significance were obtained using resampling techniques with 500 permutations.

Phenotypic diversity within each massifs and/or domains was quantified by the Shannon's index (King and Schaal, 1989). Estimates of diversity were calculated (i) for each locus i : $h'_i = -\sum \pi \log_2 \pi$, where π is the phenotypic frequencies and (ii) averaged across loci: $H' = (1/L) * \sum h'_i$, where L is the number of loci. Partitioning of diversity into within (Hpop/Hsp) and between (Ist = (Hpop-Hsp)/Hsp) components were also calculated. Hpop provides a measure of the average diversity within massifs and/or domains and Hsp a measure of the diversity within species.

Table 2 Nucleotide sequences of the 31 selected primers, concentration used in the PCR reaction (C) and number of polymorphic fragments scored (Nf).

Primers	5' → 3'	C	Nf	Primers	5' → 3'	C	Nf
OPA02	TGCCGAGCTG	0,4	3	OPD12	CACCGTATCC	0,6	2
OPA05	AGGGGTCTTG	0,4	1	OPD20	ACCCGGTCAC	0,6	4
OPA10	GTGATCGCAG	0,4	4	OPE10	CACCAGGTGA	1	5
OPA11	CAATCGCCGT	0,4	7	OPH10	CCTACGTCAG	3	6
OPB04	GGA CTGGAGT	0,4	6	DECA0502	AGCCGCTATC	0,4	4
OPB06	TGCTCTGCCC	0,4	1	DECA0509	AGGAGTAGGC	0,4	1
OPB08	GTCCACACGG	0,4	7	DECA0514	AGTCACCGCT	0,4	7
OPB14	TCCGCTCTGG	0,6	3	DECA0519	ATCAACCGGC	1	7
OPC02	GTGAGGCGTC	0,4	3	DECA0521	ATCCGGACCT	0,6	7
OPC05	GATGACCGCC	0,4	5	DECA0522	ATCGCCCTGT	0,4	3
OPC06	GAACGGACTC	0,4	3	DECA0549	CACTCGTCGT	1	3
OPC11	AAAGCTGCGG	0,4	7	DECA0550	CAGAAACCGC	0,4	3
OPC15	GACGGATCAG	0,4	2	DECA0561	CATACGGCCT	0,4	9
OPD01	ACCGCGAAGG	0,4	3	DECA0569	CCACGAATGC	0,4	5
OPD03	GTCGCCGTCA	0,4	8	DECA0573	CCAGCCGAAT	0,4	7
OPD05	TGAGCGGACA	0,4	1				

Table 3 Number of fragments with significant frequency differences between each pairwise combination of domains (1, 2) and/or French massifs (3, 4, 5). Fisher exact tests were performed on fragment frequencies with either $p < 0.05$ or $p < 0.01$ (in parentheses).

		1	2	3	4	5
1	Hercyno- Carpathian Domain	-				
2	Alpine Domain	16 (6)	-			
3	Vosges	41 (11)	38 (12)	-		
4	French Alps	49 (19)	42 (17)	29 (11)	-	
5	Jura	43 (12)	33 (11)	36 (10)	35 (12)	-

III. Results

III. 1. RAPD variation

A total of 137 reproducible and polymorphic fragments were produced by the 31 selected primers (Table 2), 130 being polymorphic among French provenances. None of them was found to be massif- or domain-specific. However, most of the fragments exhibited significant frequency variations ($p < 0.05$) between massif(s) and/or domain(s). The number of these informative fragments ranged from a minimum of 16 between the Hercyno-Carpathian and Alpine domains to a maximum of 49 between the Hercyno-Carpathian domain and French Alps massif (Table 3). Considering exclusively the French massifs, 48 informative fragments were detected, enabling discrimination between Alps and Vosges (29/48 fragments), Alps and Jura (35/48), and Vosges and Jura (36/48) massifs.

III. 2. Factorial correspondence analysis (FCA) and cluster analysis

A FCA involving all provenances is shown in Fig. 2. The first two axes explained 13% of the total variation. A clear discrimination between the central Europe and French provenances was observed along axis 1, which was found to be highly correlated with longitude ($r = 0.629$, $p < 0.001$).

The French provenances located in the right part of the plane were organized along axis 2. The cluster of Jura provenances was fairly well separated from the more scattered French Alps provenances. In contrast, the Vosges provenances were interspersed among the other massifs and domains, especially the French Alps and, to some extent, central Europe.

Correlation analysis of French trees co-ordinates on axis 2 with geographical parameters revealed variation along latitudinal gradient ($r = 0.360$, $p < 0.05$). However, no geographical structure was detected within each individual massif.

Similar results were obtained using different hierarchical grouping methods such as UPGMA and Ward clustering based on Nei (1987) or Jaccard's distances (data not shown).

A more precise investigation of the relationships between the French Alps, Jura and Vosges massifs was performed in two additional FCA using either the 130 polymorphic fragments

(Fig. 3) or the 48 informative fragments (Fig. 4). The first two axes explained 8.0 and 20.5% of the total variation in each FCA, respectively. As previously found, the discrimination between the Jura and Alps massifs was obvious and mainly obtained along axes 1. Concerning the Vosges massif, many provenances (60%) clustered apart from the Jura and, to a certain extent, from the Alps provenances in the right lower part of the planes. This separation was particularly evident in Fig. 4.

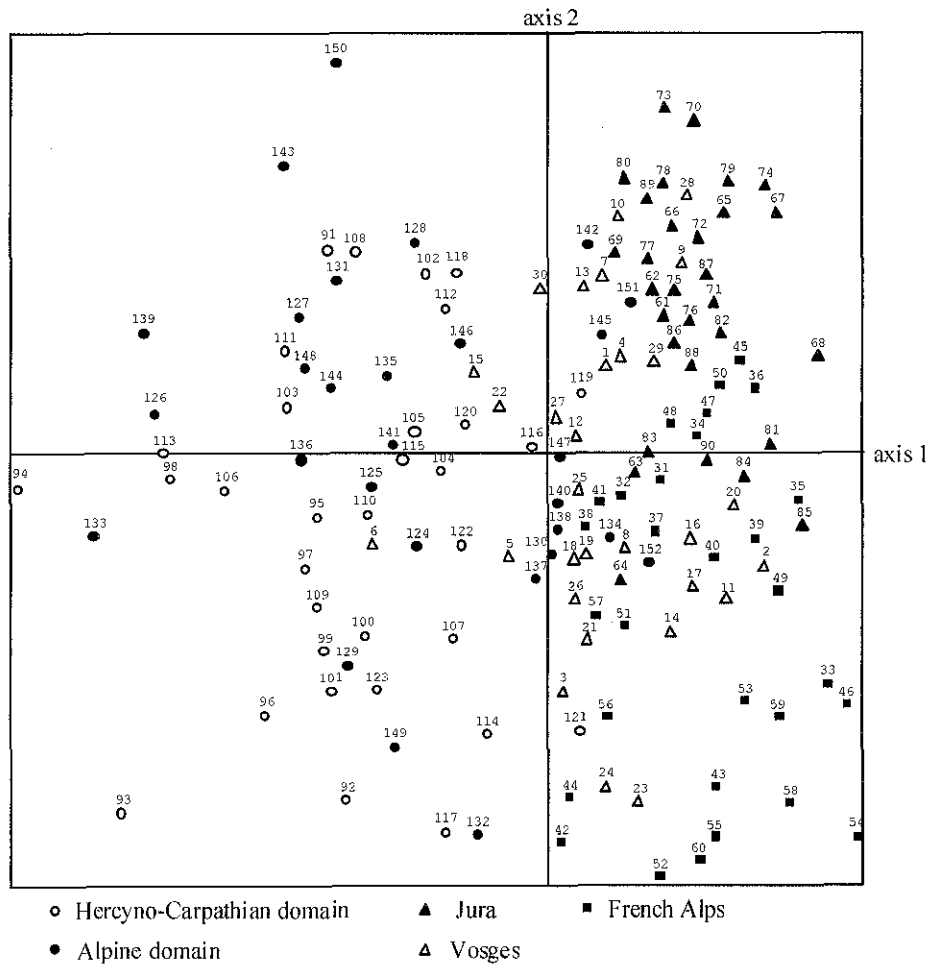


Fig. 2 Distribution of 152 spruces in the plane (1,2) of the factorial correspondence analysis (FCA) computed from 137 polymorphisms RAPDs. Tree codes are indicated in Table 1.

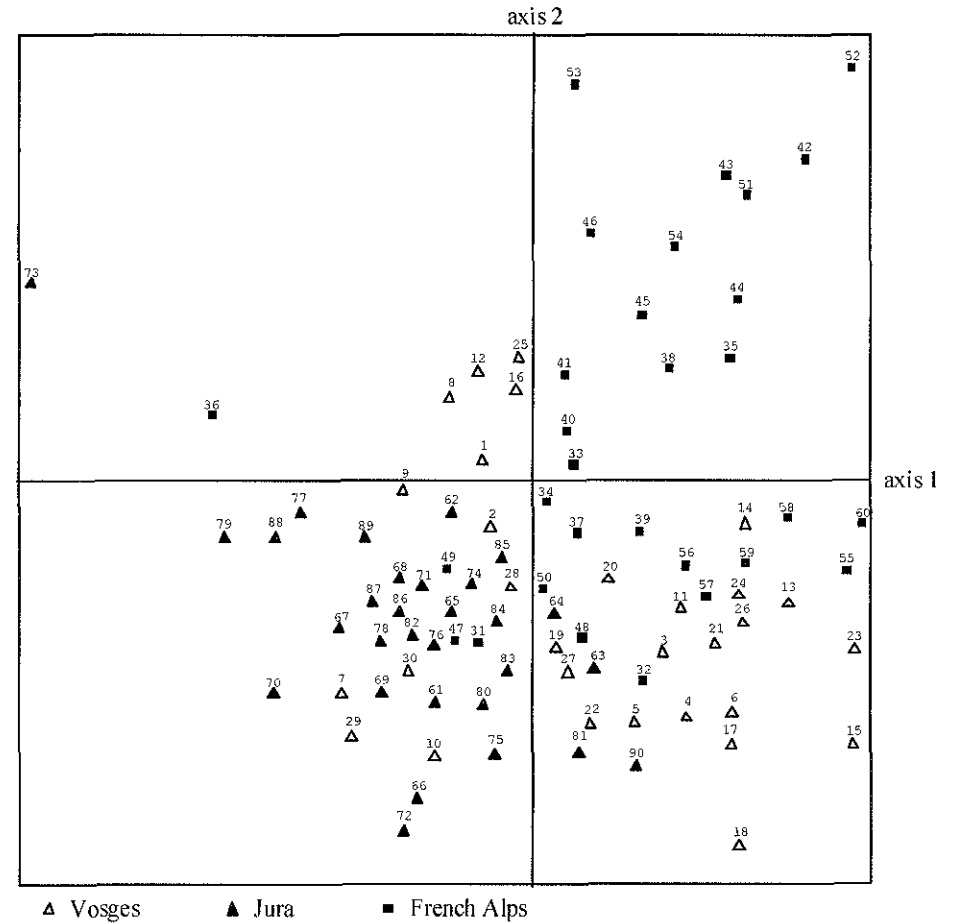


Fig. 3 Distribution of 90 French spruces in the plane (1,2) of the factorial correspondence analysis (FCA) computed from 130 polymorphisms RAPDs. Tree codes are indicated in Table 1.

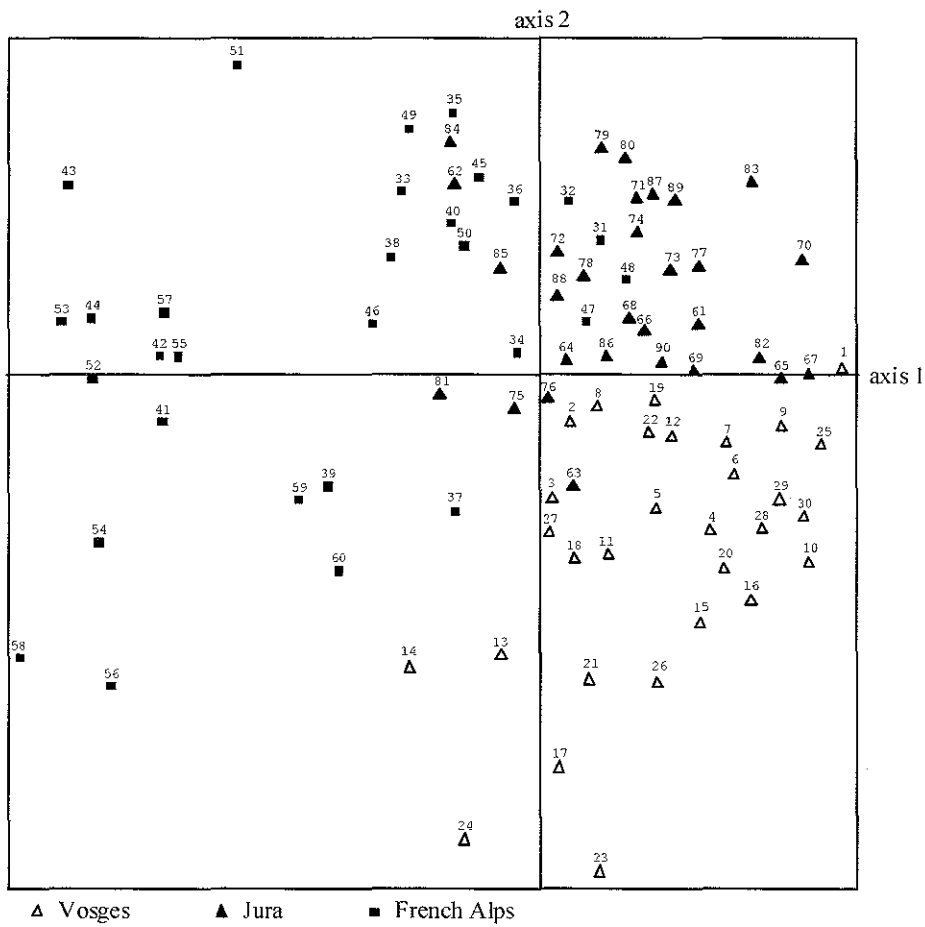


Fig. 4 Distribution of 90 French spruces in the plane $(1,2)$ of the factorial correspondence analysis (FCA) computed from 48 informative RAPDs. Tree codes are indicated in Table 1.

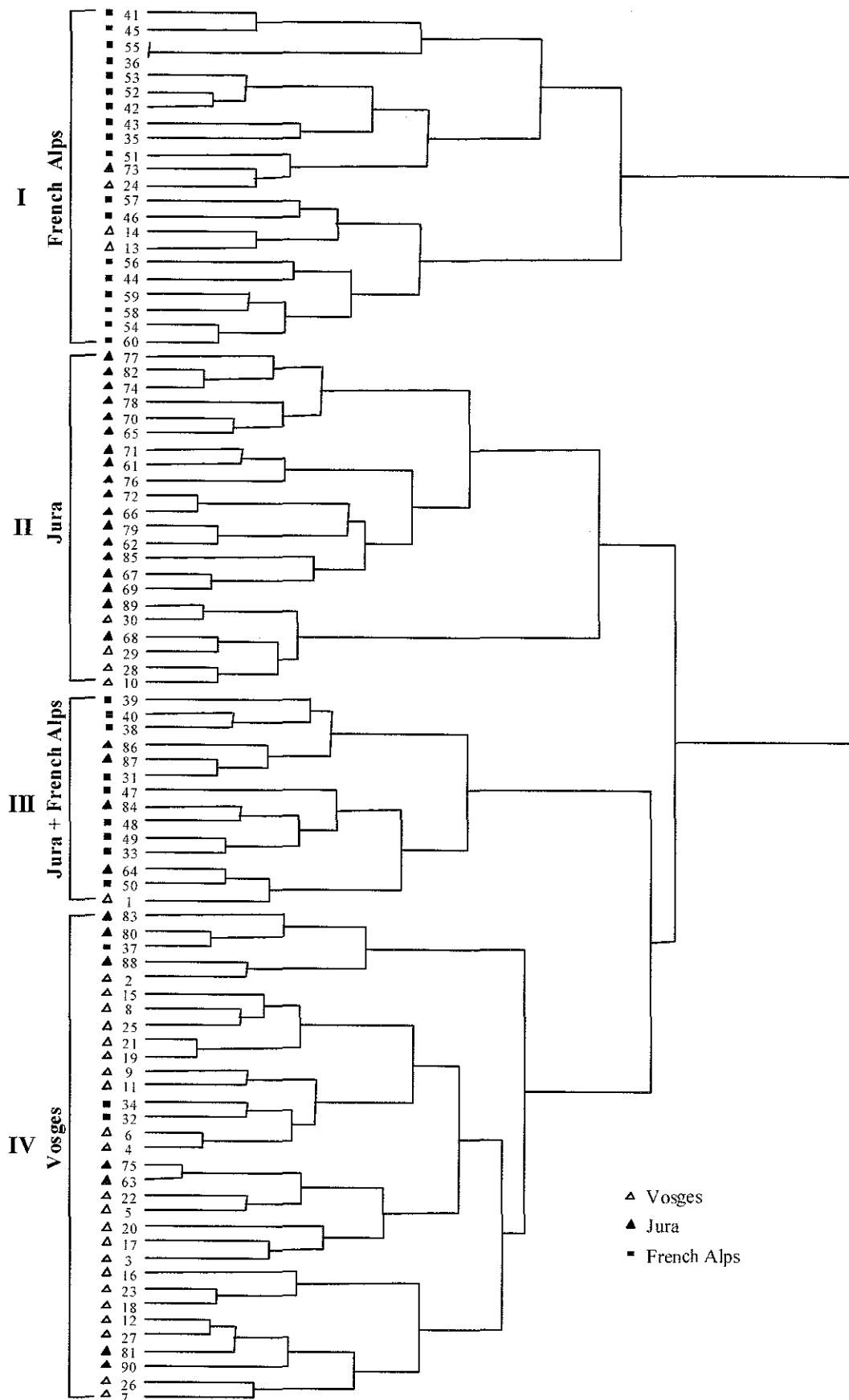


Fig. 5 Ward hierarchical aggregation of 90 French spruces based on Jaccard's distances inferred from 130 RAPD markers. Tree codes are indicated in Table 1.

Table 4 Shannon's diversity index within massifs and domains calculated from 137 RAPD markers

Domains or Massifs	H' ± SE*
Hercyno-Carpathian domain	0.705 ± 0.009
Alpine domain	0.711 ± 0.009
French Alps	0.718 ± 0.010
Jura	0.675 ± 0.010
Vosges	0.696 ± 0.009

*SE, Standard error.

Table 5 Diversity partitioning estimated from variance analysis and Shannon's index

	AMOVA	Shannon's index		
	Φst	Hpop	Hsp	Ist
Among massifs and/or domains	0.063	0.701	0.753	0.069
Among French massifs	0.042	0.696	0.736	0.054

Correlation analysis between trees co-ordinates either on the first or the second axis of the FCA involving the 130 polymorphic fragments (Fig. 3) and geographical parameters was performed. Latitudinal structure along axis 2 was detected when all provenances from the three French massifs were pooled ($r = 0.513$, $p < 0.001$). Remarkably, this latitudinal gradient was also detected within the French Alps massif ($r = -0.480$, $p < 0.01$). The westernmost provenances (Grande Chartreuse, Autrans and Chamrousse) appeared to be close to the Jura massif cluster, the northern (Chamonix, Châtel, Montriond and Lully) were close to the Vosges massif, while the southern (Saint-Martin-Vésubie, Névache, Verdache, Saint-Etienne-en-Dévoluy and Lantosque) clustered separately on the right top of the plane with the exception of tree n° 36.

Hierarchical grouping based on the Jaccard's distances resolved the individuals into four main clusters (Fig. 5). The first contained all the southern provenances from the French Alps, the second contained part of the Jura provenances, the third was composed of a mix of the northern-Alps and Jura provenances and the last consisted of almost all the Vosges provenances.

III. 3. Phenotypic diversity and differentiation

The 137 polymorphic fragments were used to calculate the phenotypic diversity and differentiation estimates (Tables 4-5). Shannon's diversity index (H') within each massif and domain showed high level of diversity (Table 4). H' ranged from 0.675 to 0.718. The observed between-massif and/or -domain differences were not significant.

Low levels of differentiation among massifs and/or domains were revealed either with AMOVA ($\Phi_{st} = 0.063$) or Shannon's index ($I_{st} = 0.069$). These values were lower when the analysis was restricted to the 3 French massifs (Table 5).

IV. Discussion

IV. 1. Diversity and differentiation

In this RAPD investigation, *Picea abies* appears to maintain high level of diversity as observed in most woody plants (Hamrick, Godt and Sherman-Broyles, 1992). Especially, coniferous species often combine the life history and ecological characteristics that ensure the preservation of the diversity (large and continuous populations, long life cycle, outcrossing breeding systems, and relatively long distance pollen and seed movement). In addition, other factors such as the evolutionary history of the species must have a major influence on diversity level, i.e., species that originated from large populations should have more variation than species originating from a limited number of individuals (Hamrick *et al.*, 1992).

The values of diversity indices obtained in the five large areas sampled (Hercyno-Carpathian and Alpine domains, Vosges, Jura and French Alps) are very similar (0.675 to 0.718), and, of the same magnitude than those estimated from RAPDs within several French populations

(Collignon *et al.*, in prep.). Theoretically, genetic variation is supposed to be less in marginal populations than in more central populations (Mayr, 1970; Levin, 1970; Lawton, 1993) because of genetic drift promoted by reduced gene flow and founder effect (Nei, Maruyama and Chakraborty, 1975; McCommas and Bryant, 1990). However, efficient wind pollen- and seed-dispersal associated with high level of outcrossing in conifers can maintain intense gene flow in marginal populations (Tigerstedt, 1973) resulting in similar levels of diversity in both marginal and central populations (Yeh and El-Kassaby, 1980; Wheeler and Guries, 1982; Furnier and Adams, 1986; Tremblay and Simon, 1989; Scaltsoyiannes *et al.*, 1994; Prus-Głowacki and Stephan, 1994). In addition, there has been probably not enough time since the recent expansion of *Picea abies* in the French area (4500 years ago: Wegmüller, 1977; Kalis, 1984; De Beaulieu 1977; De Beaulieu *et al.* 1994) to allow effective divergence of marginal populations by selection or drift.

The partitioning of diversity revealed that 93.1% of the variation was maintained within the central Europe domains and/or French massifs. These results are consistent with the general observation that woody species and especially conifers maintain most of their variation within population (Stoehr and El-Kassaby, 1991; Giannini *et al.*, 1991; Hamrick *et al.*, 1992; Müller-Starck, Baradat and Bergmann, 1992; Krutovskii and Bergmann, 1995). The Φ_{st} (AMOVA) considered as the less unbiased differentiation coefficient for RAPD analysis (Isabel *et al.*, 1995, 1999) is in the same magnitude than the other phenotypic coefficient (Shannon's index). Although large areas (domains and massifs) have been considered as populations, the differentiation coefficient for the total sampled area (6.3%) is in the same order than those generally expected from single populations of conifers and outbreeding species such as *Picea abies* (Hamrick *et al.*, 1992). Lagercrantz and Ryman (1990) evaluated to 5% the genetic differentiation of 70 populations of *Picea abies* distributed on the whole European range while Giannini *et al.* (1991) found a G_{st} value of 4.4% investigating 9 Italian populations. More recently, Müller-Starck (1995) estimated the genetic differentiation of 20 Swiss populations to be 4.3%.

IV. 2. Geographical pattern of molecular variation in relation with the presumed postglacial re-immigration routes

RAPD data have been treated in a qualitative fashion and subjected to descriptive analyses such as cluster or factorial analysis. This approach is particularly interesting to correlate molecular variations with geographical parameters such as latitude, longitude or altitude in order to reveal possible clinal structuring. The two principal synthetic variables stand for a low proportion of the total variation and the inertia rate of the principal axes is lower than 10%. This situation contrasts markedly with other molecular studies using RAPDs to evaluate genetic variation between species (Chalmers *et al.*, 1994) or between herbaceous plants accessions (Orozco-Castillo *et al.*, 1994; Heun, Murphy and Philips, 1994) where the two first axis accounts

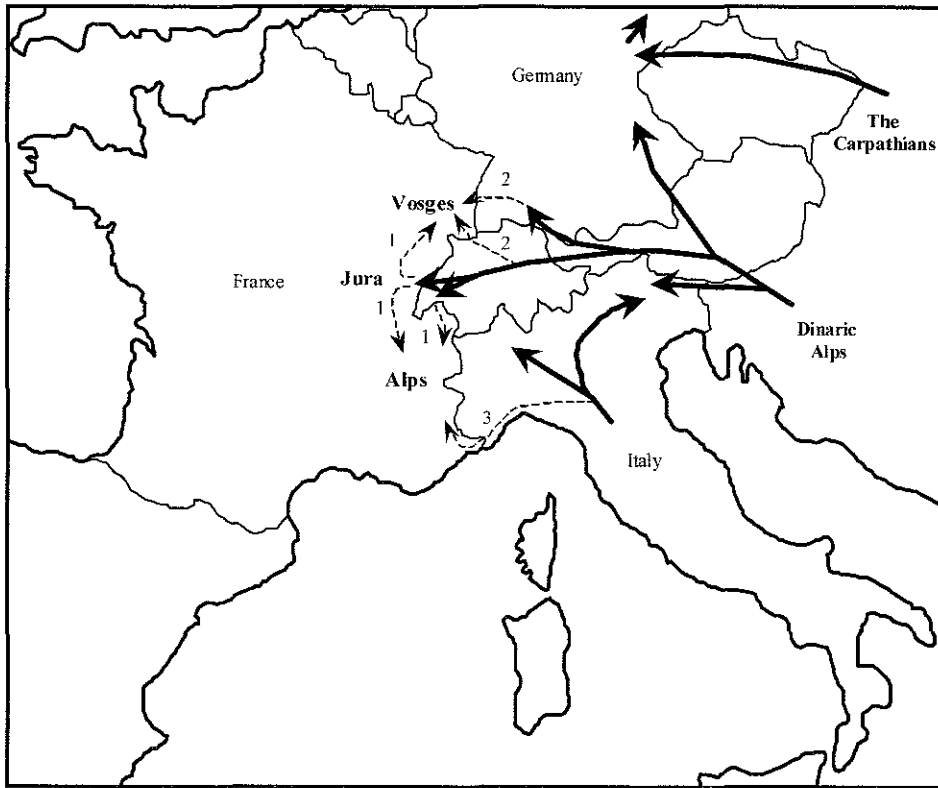


Fig. 6 Presumed postglacial re-immigration ways of *Picea abies* in central Europe. The grey arrows represent the ways reported from Schmidt-Vogt (1976, 1986), Giannini *et al.* (1991) and Burga (1988) studies. The numbered black arrows represent the supported ways deduced from our RAPD data (see discussion).

for more than 45% of the variation. This can be partly related to the great number of random markers analysed and the genome characteristics of the species studied. Conifers have indeed large genomes (29 pg/2C in *Picea abies*: Dhillon, 1987) which are mainly composed of repetitive and potentially variable non-encoding DNA (75%). Thus, the total molecular variation detected is high and difficult to summarise on a factorial plane. Comparatively to the great number of loci analysed (137 loci), it can be assumed that the variation represented by the two first axes of the FCA is significant (Lebart, Morineau and Piron, 1997).

On the basis of both FCA and clusters analyses, two main groups can be distinguished, one including the central Europe provenances and the second the French provenances. This pattern reveals a clear longitudinal gradient across the large area sampled and supports the hypothesis of re-immigration in a East-West direction from Eastern Europe to France. This major migration way is commonly accepted from pollen data analyses (Huntley and Birks, 1983) and from studies of morphological and isozyme variations as well (Lagercrantz and Ryman, 1990). During the Holocene, the re-invasion of Europe by *Picea abies* had probably occurred from glacial refuge zones located in the Moscow area and in the eastern part of the major European mountains such as the Carpathians and the Dinaric Alps. Spruce expanded steadily but relatively slowly along the European mountains at rates of 80-240 m.yr⁻¹, reaching eastern Switzerland 6000-4800 years ago and the lake Geneva region as well as the South Swiss Jura 4800-2800 years ago (Firtion 1950; Wegmüller 1977; Burga, 1988). Thus, the spreading of *Picea abies* within the French area probably started in the Jura mountains and then continued towards the Alps in south direction and the Vosges in north direction.

Remarkably, we effectively evidenced latitudinal gradients at the western limit of *Picea abies* natural range as well as clear molecular relationships between Vosges and Jura spruces and between Jura and northern Alps spruces, supporting for the first time the main re-immigration ways from Jura mountains to the French Alps and Vosges using molecular markers (ways 1, Fig.6). However, the high molecular variability observed in the Vosges and even more in the French Alps compared with the Jura suggested additional recolonisation ways in these massifs. Concerning the Vosges, two dates of possible expansion, either 3500 years BP from Jura mountains or 2500 years BP from Black Forest and/or Swiss plain were proposed from pollen data (Kalis, 1984). Some Vosges trees were interspersed with central European provenances on the factorial plane. This strongly suggests possible migratory ways coming straight from central Switzerland and/or Black Forest which is only 75 km apart from the Vosges (ways 2, Fig.6).

The high level of diversity observed in the Vosges could also be explained by anthropic actions. Indeed the small and disseminated indigenous stands in this massif are exposed to introgression from surrounding artificial populations which consist mainly in allochthonous material.

In the French Alps, latitudinal structuring is evident and three regions could be discerned. The first one consists of the westernmost region (Grande Chartreuse) which is genetically close

to the Jura, the second consists of the northern provenances (Chamonix region) and the third of the southernmost provenances. These southern French Alps provenances remarkably differed from the others in their molecular pattern and are known to be especially adapted to Mediterranean climate (Bouvarel, 1961). Such adaptive differentiation cannot be simply explained by genetic drift in a recolonisation scheme initiated from Jura mountains because the number of generation is generally considered too small (about 50 generations) for new mutations to have a noticeable impact (Maruyama and Fuerst, 1985; Leisica and Allendorf, 1995)

Interestingly, the genetic differences of some Italian (Borghetti, Giannini and Menozzi, 1988; Giannini *et al.*, 1991) and Swiss populations (Müller-Starck, 1995) in their allelic composition suggested a postglacial re-immigration way coming from a putative additional refuge located in the Apennines (Italy) (Giacomini, 1958; Ferrarini, 1977; Magini *et al.*, 1980) and mentioned by Krutzsch (1992). As many other species such as *abies Alba* and *Quercus sp.* (Konnert and Bergmann, 1995; Dumolin-Lapègue *et al.*, 1997), *Picea abies* could have skirt the Mediterranean sea from Tuscan Apennines and recolonised the southernmost French Alps before the dates generally proposed (3000 years BP) (way 3, Fig.6). This hypothesis is clearly supported by the palynological observations of de Beaulieu (1977) who indicated the presence of *Picea abies* in the Mercantour (southeastern Alps) 4000-4500 years ago. Interestingly, this author further invoked a relictual glacial refuge in southern French Alps.

Acknowledgements: Authors wish to thank M. Vernier and collaborators (Unité Expérimentale d'Amélioration des Arbres Forestiers, Institut National de la Recherche Agronomique, Nancy, France), especially F. Bonne, L. Burnel, R. Herbeck and A. Nassau for their help in samples collection and their skill to shoot needles on adult spruces. Grateful thanks are also extended to Dr JL. Dupouey (INRA Nancy) for the critical reading of the manuscript. This work is part of a genetic resources research programme supported by the French Ministries of environment and agriculture.

V. References

- Beaulieu JL De. 1977.** Contribution pollenanalytique à l'histoire tardiglaciaire et holocène de la végétation des Alpes méridionales françaises. PhD thesis, University of Aix-Marseille III
- Beaulieu JL De, Richard H, Ruffaldi P, Clerc J. 1994.** History of vegetation, climate and human action in the French Alps and the Jura over the last 15,000 years. *Dissertationes Botanicae* **234** : 253-275
- Borghetti M, Giannini R, Menozzi P. 1988.** Geographic variation in cones of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genetica* **37**: 178-184.

- Bouvarel P. 1961.** Observation sur la date de l'aoûtement de quelques provenances françaises d'Epicéa. Annales Nationale des Eaux et Forêts et de la Station de Recherche et Expérience **18**: 99-129.
- Bucci G, Menozzi P. 1995.** Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst. population. Heredity **75**: 188-197.
- Burga CA. 1988.** Swiss vegetation history during the last 18 000 years. New Phytologist **110**: 581-602.
- Chalmers KJ, Newton AC, Waugh R, Wilson J, Powell W. 1994.** Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics **89**: 504-508.
- Demesure B, Comps B, Petit RJ. 1996.** Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. Evolution **50**: 2515-2520.
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ. 1997.** Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. Genetics **146**: 1475-1487.
- Dhillon SS. 1987.** DNA in tree species. In: Bonga JM, Deuzan DJ (eds) Cell and tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff publisher, Dordrecht, pp 298-313.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin **19**: 11-15.
- 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.
- Ferrarini E. 1977.** Cenosi a *Picea abies* L. relitte sull'Appennino. Annali Accademia Italiana de Scienze Forestali **26**: 185-237.
- Firton F. 1950.** Contribution à l'étude paléontologique, stratigraphique et physico-chimique des tourbière du Jura français. Mém Serv Carte Géol Alsace et Lorraine **10**, 92p
- Furnier GR, Adams WT. 1986.** Geographic patterns of allozyme variation in Jeffrey pine. American Journal of Botany **73**: 1009-1015.
- Giacomini V. 1958.** La flora. In: Conosci l'Italia, vol II. Touring Club Italiano, Milano.
- Giannini R, Morgante M, Vendramin GG. 1991.** Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. Silvae Genetica **40**: 160-166.
- Goncharenko GG, Zadeika IV, Birgelis JJ. 1995.** Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in natural populations of Latvia. Forest Ecology and Management **72**: 31-38.
- Guries RP, Ledig FT. 1982.** Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). Evolution **36**: 387-402.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL. 1992.** Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests **6**: 95-124.
- Heun M, Murphy JP, Phillips TD. 1994.** A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. Theoretical and Applied Genetics **87**: 689-696.
- Huntley B, Birks HJB. 1983.** An atlas of past and present pollen maps for Europe, 0-13,000 years ago. Cambridge University Press, Cambridge.

- Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J. 1995.** Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **92**: 6369-6373.
- Isabel N, Beaulieu J, Thériault P, Bousquet J. 1999.** Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* **8**: 477-483.
- Jaccard P. 1908.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise de Sciences Naturelles* **44**: 223-270.
- Kalis AJ. 1984.** L'indigénat de l'Epicéa dans les Hautes-Vosges. *Revue de Paléobiologie de Genève Vol sp Avril*: 103-115.
- King LM, Schaal BA. 1989.** Ribosomal DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution* **43**: 1117-1119.
- Konnert M. 1991.** Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald: Genetische Variation und Korrelationen. *Fortwissenschaftliches Centrablatt* **110**: 84-94.
- Konnert M, Bergmann F. 1995.** The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, *Pinaceae*) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution* **196**: 19-30.
- Krutovskii KV, Bergmann F. 1995.** Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity* **74**: 464-480.
- Krutzsch P. 1992.** IUFRO's role in coniferous tree improvement: Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genetica* **41**: 143-150.
- Lagercrantz U, Ryman N. 1990.** Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* **44**: 38-53.
- Lawton JH. 1993.** Range, population abundance and conservation. *Trends in ecology and evolution* **8**: 409-413.
- Lebart L, Morineau A, Piron M. 1997.** *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, Paris.
- Leisica P, Allendorf FW. 1995.** When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* **9**: 753-760.
- Levin DA. 1970.** Developmental instability and evolution in peripheral isolates. *American Naturalist* **104**: 343-353.
- Lewandowski A, Burczyk J, Chalupka W. 1997.** Preliminary results on allozyme diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Poland based on plus tree investigations. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **66**: 197-200.
- Li P, Adams WT. 1989.** Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Canadian Journal of Forest Research* **19**: 149-161.
- Magini E, Pelizzo A, Proietti Placidi AM, Tonarelli F. 1980.** La picea dell'Alpe delle tre potenze. Areale-Caratteristiche-Pozizione sistematica. *Annali Accademia Italiana de Scienze Forestali* **29**: 107-210.
- Maruyama T, Fuerst PA. 1985.** Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics* **111**: 675-689.
- Mayr E. 1970.** *Populations, species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge.

- McCommas SA, Bryant EH. 1990.** Loss of electrophoretic variation in serially bottlenecked populations. *Heredity* **64**: 315-321.
- Müller-Starck G, Baradat P, Bergmann F. 1992.** Genetic variation within European tree species. *New Forests* **6**: 23-47.
- Müller-Starck G. 1995.** Genetic variation in high elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Switzerland. *Silvae Genetica* **44**: 356-362.
- Myburg H, Harris SA. 1997.** Genetic variation across the natural distribution of the South East Asian pine, *Pinus kesiya* Royle ex Gordon (*Pinaceae*). *Silvae Genetica* **46**: 295-301.
- Nei M. 1987.** Molecular evolutionary genetics. Columbia university press, New York.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975.** The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**: 1-10.
- Orozco-Castillo C, Chalmers KJ, Waugh R, Powell W. 1994.** Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **87**: 934-940.
- Prus-Glowacki W, Stephan BR. 1994.** Genetic variation of *Pinus sylvestris* from Spain in relation to other European populations. *Silvae Genetica* **43**: 7-14.
- Scaltsoyiannes A, Rohr R, Panetsos KP, Tsaksira M. 1994.** Allozyme frequency distributions in five European populations of black pine (*Pinus nigra* Arnold). *Silvae Genetica* **43**: 20-30.
- Schmidt-Vogt H. 1976.** Fichtenherkünfte (*Picea abies* [L.] Karst.) der Bundesrepublik Deutschland. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung* **147**: 149-163.
- Schmidt-Vogt H. 1986.** Die Fichte. Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- Steinhoff RJ, Joyce DG, Fins L. 1983.** Isozyme variation in *Pinus monticola*. *Canadian Journal of Forest Research* **13**: 1122-1132.
- Stoehr MU, El-Kassaby YA. 1991.** Levels of genetic diversity at different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia. *Theoretical and Applied Genetics* **94**: 83-90.
- Stütz HP. 1990.** Genetische differenzierung und natürliche Selektions-faktoren der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) in einem zentralalpinen Gebiet der Schweiz. Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich Dissertation 9101, pp 128.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 1998.** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier JP. 1997.** ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* **7**: 75-83.
- Tigerstedt PMA. 1973.** Studies on isozyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*. *Hereditas* **75**: 47-60.
- Tomaru N, Mitsutsuji T, Takahashi M, Tsumura Y, Uchida K, Ohba K. 1997.** Genetic diversity in *Fagus crenata* (Japanese beech): influence of the distributional shift during the late-Quaternary. *Heredity* **78**: 241-251.
- Tremblay M, Simon JP. 1989.** Genetic structure of marginal populations of white spruce (*Picea glauca*) at its northern limit of distribution in Nouveau-Québec. *Canadian Journal of Forest Research* **19**: 1371-1379.
- Ward JH. 1963.** Hierarchical grouping to optimize an objective function. *American Statistical Association Journal March*: 236-244.

- Wegmüller S. 1977.** Pollenanalytische Untersuchungen zur Spät- und postglazialen Vegetationsgeschichte der französischen Alpen (Dauphiné). Haupt, Bern.
- Wheeler NC, Guries RP. 1982.** Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. Canadian Journal of Forest Research **12**: 595-606.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research **18**: 6531-6535.
- Yeh FC, El-Kassaby YA. 1980.** Enzyme variation in natural populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). 1. Genetic variation patterns among trees from 10 IUFRO provenances. Canadian Journal of Forest Research **10**: 415-422.
- Yeh FC, Khalil MAK, El-Kassaby YA, Trust DC. 1986.** Allozyme variation in *Picea mariana* from Newfoundland: genetic diversity, population structure, and analysis of differentiation. Canadian Journal of Forest Research **16**: 713-720.

Conclusion

L'analyse qualitative des données (analyses factorielles et groupements hiérarchiques) révèle une nette différenciation des provenances françaises par rapport aux autres provenances européennes des domaines hercyno-carpathique et alpin. Les variations observées sont fortement corrélées avec la longitude. Ces résultats confirment les hypothèses de recolonisation depuis les Carpathes et les Alpes dinariques jusqu'au Jura, émises jusqu'ici à partir de données polliniques (Huntley et Birks 1983).

En revanche, les analyses de diversité ne montrent aucune différence significative entre les différents groupes de provenances analysés. L'essentiel de la diversité (>93%) est situé au sein de chaque massif et la différenciation est faible.

L'examen approfondi de la variation moléculaire au sein des différents massifs de l'aire française révèle un gradient latitudinal et de fortes ressemblances génétiques entre les provenances des Vosges et du Jura d'une part et entre les provenances du Jura et du nord des Alpes d'autre part. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse d'un chemin de migration principal venant de Suisse, traversant le Jura et se dirigeant ensuite vers les Vosges au Nord et vers les Alpes au sud. Ce schéma n'est cependant pas suffisant pour expliquer toutes les variations observées entre les différentes provenances sur les plans factoriels et dans le dendrogramme. Les provenances vosgiennes en effet se dispersent parmi les provenances des Alpes, du Jura mais aussi parmi les provenances d'Europe centrale. La recolonisation des Vosges ne proviendrait donc pas seulement d'un flux venant du Jura mais aussi d'autres flux venant du plateau suisse et/ou de la Forêt-Noire distants seulement de 75 km. On ne peut pas non plus complètement exclure l'implication d'effets anthropiques dans une région où les forêts ont été profondément et anciennement remaniées par l'homme.

Dans les Alpes, les variations observées sont fortement corrélées à un gradient latitudinal, les provenances situées au sud de la Durance étant très différentes des autres. En fait, trois groupes apparaissent nettement : les provenances de l'ouest (Grande Chartreuse) qui sont les plus proches génétiquement de celles du Jura, les provenances les plus au Nord (région de Chamonix), puis un groupe bien distinct des deux autres contenant les provenances les plus au sud. Ces résultats sont en accord avec les conclusions des analyses polliniques (De Beaulieu 1977 ; Wegmüller 1977). En effet l'examen des pollens fossiles a permis d'établir que l'Epicéa est arrivé via le Jura, d'abord dans les Alpes occidentales, puis dans les Alpes du nord. Dans le sud, les analyses polliniques suggèrent une présence plus ancienne, sans doute à partir d'un refuge méridional. Ce refuge glaciaire supplémentaire pourrait avoir été localisé dans les Apennins toscans et correspondrait ainsi à celui évoqué par Giannini *et al.* (1991). Comme pour d'autres espèces (Sapin, Chêne, Hêtre...) on peut penser que l'Epicéa des Alpes du sud est venu d'Italie en longeant la mer Méditerranée.

Chapitre IV : Variation moléculaire au sein de quelques populations françaises : cas particulier des populations autochtones des Vosges

Les chapitres précédents nous ont permis d'évaluer les liens moléculaires entre des provenances assez éloignées géographiquement les unes des autres. Les résultats acquis nous ont ainsi montré que les variations observées pouvaient être liées à l'histoire glaciaire et/ou postglaciaire de l'Epicéa. L'aire française a pu être ainsi divisée en 4 zones principales : le Jura, les Alpes du Nord, les Alpes du Sud et les Vosges. Dans cette zone, contrairement aux Alpes et au Jura où l'Epicéa est distribué en larges peuplements organisés en fonction des traits géomorphologiques (vallées, plateaux...), les populations indigènes présentent une situation tout à fait particulière. Comme nous l'avons déjà indiqué dans l'introduction, elles sont en effet de taille réduites (quelques dizaines d'hectares) et disséminées au milieu de larges peuplements introduits, d'origine généralement inconnue. De plus, le massif vosgien est lui-même disjoint des autres régions indigènes françaises.

Dans cette partie, nous avons essayé d'analyser les variations de ces populations et nous les avons comparées aux autres populations indigènes françaises issues des zones mises en évidence précédemment (Jura, Alpes du Nord et Alpes du Sud).

Parmi, les 22 stations recensées comme indigènes par Tondon (1992), nous en avons sélectionné 3, considérée comme particulièrement représentatives du fait de leur caractéristique phénotypique (port colonnaire). Dans ces stations, nous avons choisi des arbres atteignant 200 ans, afin de minimiser les risques d'introgression à partir des populations artificielles environnantes. On admet en effet que les premières plantations connues ont eu lieu vers 1820, il y a donc seulement 180 ans environ.

A titre de référence, nous avons également inclus une population allochtone vosgienne dont l'origine est inconnue, et une population verger-à-graines localisée dans le département du Lot et ayant pour origine l'est des Carpathes.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article suivant : "RAPD variation among autochthonous and planted populations of *Picea abies* from the Vosges mountains in reference to other French populations." Soumis.

RAPD variation among autochthonous and planted populations of *Picea abies* from The Vosges Mountains in reference to other French populations.

Anne-Marie Collignon, Sylvain Jeandroz and Jean-Michel Favre

Abstract : Genetic variation in French populations of *Picea abies* (allochthonous and planted populations) were studied with RAPD markers. The study was based on a genotypic analysis (Nei's parameters) by assessing alleles frequencies from dominant markers data and on phenotypic analysis requiring any assumption and only based on banding pattern of each individual (AMOVA and FCA analysis). 109 markers generated by 30 primers were scored.

Levels of genetic diversity estimated by Nei's parameters did not varied substantially among the French populations of *Picea abies*. Autochthonous and planted populations are quite similar. The AMOVA analysis showed that 10.4% of the total variation was accounted to among population differentiation. The G_{st} value (6%) appeared to be slightly lower. In addition the two level AMOVA, as well as the FCA, revealed that differentiation among populations is partly due to the geographical distance between the analysed populations, the greater differentiation being observed between the four groups Vosges, Alps/Jura, Southern Alps and seed Orchard. UPGMA clustering of populations based on Nei's genetic distance (Nei, 1978) revealed many similarities with FCA. These results are concordant with the postglacial history of *Picea abies* at the western margin of this natural area.

Keywords: RAPD, genetic variation, *Picea abies*, diversity

I. Introduction

Intensification of phenomenous often associated to human activities such as deforestation, environmental pollution (Ziehe *et al.* 1987; Peters 1990; Gravenhorst 1991), genetic contamination, artificial regeneration, forest fire, or sanitary risks such as insects and plant diseases, seriously poses a threat to the forest gene diversity. Tropical rain forests are of course the most concerned but it is also urgent to bring corrective action within forests of temperate zone (Arbez 1994).

In these temperate forests, the impact of intensive forestry and the transfer of seeds or plants on long distances may have important ecological as well as genetic consequences (Ledig 1992).

Artificial reforestation has, in many cases, disturbed the genetic structure of natural stands, eliminating local patterns of variation by pollen and seeds migrations from neighbouring plantations. Such contaminations of natural stands can also result in an increased genetic diversity in the next generations, but frequently with negative consequences for local adaptation (Ledig 1992).

Picea abies is widely distributed among the European continent, extending from Atlantic Ocean to Ural mountains and from Northern Norway to Greece. This species is concerned by one of the four pilot gene conservation networks created for forest tree species in Europe (Arbez 1994), especially owing to the decline caused by air pollution in forests of central Europe. In addition, within this wide distribution area which conceals high variability has been described, some valuable ecotypes are threatened with extinction and/or with genetic pollution from surrounding plantations of unknown origin.

In France, one autochthonous ecotype of prime interest (Bouvarel and Jacamon 1959) occurs in the Vosges mountains, which are located at the westernmost limit of the natural distribution area of the species (Kalis 1984). These trees exhibit pendent and thin branches with excellent natural pruning that look them a columnar form, which is particularly well adapted to strong wind, frost and abundant snowfall (Bouvarel and Jacamon 1959; Bouvarel 1961; Lacaze 1969, 1970). These autochthonous populations, which represent less than 1% of spruce are disseminated on rough rocky slopes or peat stands (Perrin 1964; Tondon 1992). They are subjected to pollen flow from the ancient surrounding plantations massively made at the end of the XIXe century or after the Second World War.

In this study, we report the use of RAPD markers to assess the genetic variation among these autochthonous disseminated *Picea abies* populations of the Vosges mountains in comparison with other French autochthonous populations from the Jura and Alps mountains in which *Picea abies* occurs in vast populations structured around geomorphologic traits such as valleys or plateaux. These autochthonous population can be considered as a good example to evaluate the influence of isolation and small size of populations on genetic diversity parameters. An allochthonous Vosges local population and a seed orchard were also included in the study.

Since their development early in this decade (Welsh and McClelland 1990; Williams *et al.* 1990), RAPDs has been used in many different fields of forest genetics, including genetic mapping (Binelli and Bucci 1994 ; Bucci *et al.* 1997; Hurme and Savolainen 1999), characterization of genetic resources (Geburek 1997; Palacios *et al.* 1997; Gillies *et al.* 1997; Dawson and Powell 1999), discrimination among closely related taxa (Khasa and Dancik 1996), description of natural introgressive hybridisation (Perron and Bousquet 1997), identification of clones (Castiglione *et al.* 1993 ; Van de Ven and McNicol 1995 ; Scheepers *et al.* 1997), somaclonal variation (Isabel *et al.* 1993 ; Fourré *et al.* 1997) or phylogeography (Lecorre *et al.* 1997; Collignon and Favre 2000). Their ability to be used on high number of samples and low DNA amounts, account for this wide range of applications.

Table 1: Characteristics of the eight *Picea abies* populations included in the study. N denotes the sample size of each population, He the expected genetic diversity estimates (Nei 1978).

Population	code	N	Massifs	Latitude, longitude	Status of stand	He ^a	He ^b
Le Kertoff	KERT	34	Vosges	48°06'N, 6°51'E	Autochtonous	0.295	0.253
Straiture	STRA	30	Vosges	48°06'N, 6°57'E	Autochtonous	0.299	0.266
Granges/Vologne	GRVO	30	Vosges	48°07'N, 6°49'E	Autochtonous	0.295	0.257
La Chaume Fancis	CHFR	30	Vosges	48°03'N, 6°55'E	Planted	0.294	0.243
St-Laurent-en-Grandvaux	SLAU	31	Jura	46°35'N, 5°58'E	Autochtonous	0.300	0.254
Ste-Foy-Tarentaise	SFOY	30	Alps	45°24'N, 6°49'E	Autochtonous	0.280	0.234
Le Boréon	BORE	31	Alps	44°04'N, 7°15'E	Autochtonous	0.263	0.245
Rachovo	RACH	32	Massif Central	44°52'N, 2°02'E	Seed Orchard	0.271	0.247

^a, using all the 109 polymorphic fragments

^b, using fragments with frequencies inferior to 1-3/N

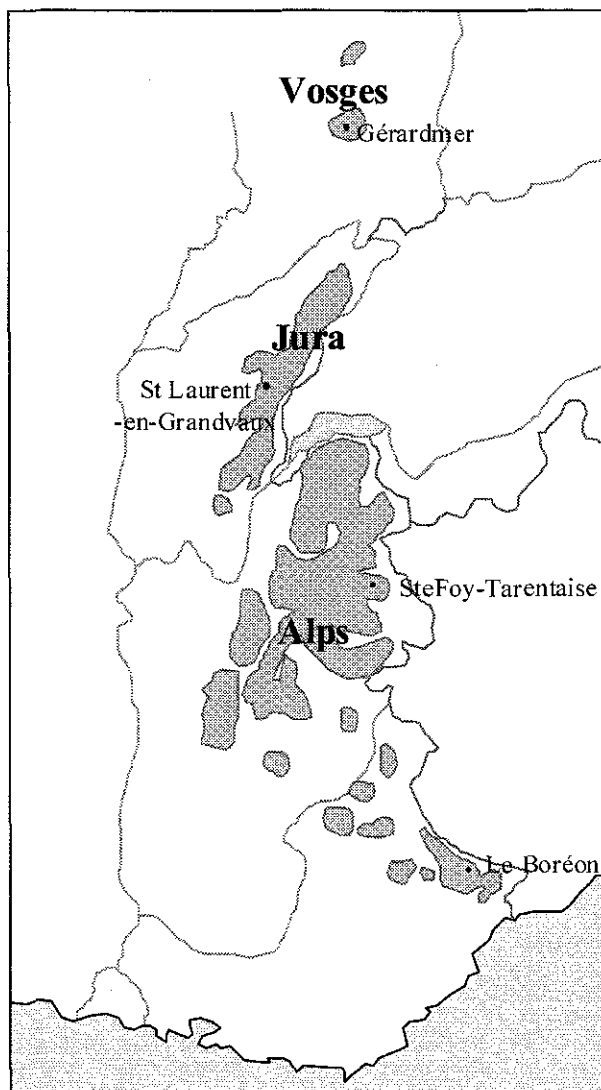


Fig. 1 Natural French area of *Picea abies* and location of the 8 studied populations.

However, one disadvantage of RAPD markers for population genetic studies is that the majority of the alleles segregate as dominant markers and consequently do not allow direct estimate of allele frequencies (Lynch and Milligan 1994; Isabel *et al.* 1995). To infer allele frequencies from fragment frequencies, several conditions are required, the main one being that the analysed populations satisfy the assumption of the Hardy-Weinberg model (Lynch and Milligan 1993). Consequently, in this paper, the RAPD data have been analysed using two different methods. The first one consists in phenotypic analysis, i.e. based on the similarity of the patterns 1/0 obtained from each individual that does not require any genetical preliminary assumption. The second one consists in genotypic analysis based on allele frequencies estimated from fragment frequencies according to Lynch and Milligan (1993).

II. Material and methods

II. 1. Plant materials

Three autochthonous populations (KERT, STRA and GRVO) were sampled in the Vosges massif. All sampled trees were older than 200 years old and clearly exhibited the typical autochthonous phenotype. These 3 populations were compared with one local planted population (CHFR) and three autochthonous populations of the other French massifs, Jura (SLAU) and Alps (SFOY and BORE). In addition, we analysed 30 trees from a seed orchard (RACH) initially originating in Eastern Europe and established outside the natural area of *Picea abies* in south-west France (Massif Central).

Designations, code, exact sample size and geographical origin of the eight populations investigated are shown in Table 1 and Fig. 1. The collected needles were frozen at -80°C until DNA extraction.

II. 2. DNA extraction

DNA was isolated from 1 g of needles using the Doyle and Doyle (1987) protocol with 1% 2-mercaptoethanol (v/v) and 1% PVP 40 000 (w/v) added in the CTAB extraction buffer. The extractions were performed using chloroforme-octanol (24:1) instead of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) and the resulting DNA pellet was washed with 70% ethanol before the final suspension step. DNA concentrations were determined by comparison with serial dilution of standard phage lambda DNA.

II. 3. RAPD analysis

Thirty random decamer primers obtained from Operon Technologies (Alameda, USA) and Genosys Biotechnologies (Cambridge, UK) were selected among 200 tested for clarity and

reproducibility of the produced patterns. DNA amplification was performed in 15 μ l total volume containing 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 200 μ M each of dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0.4 μ M primer, 12.5 ng of genomic DNA template and 0.4 units of *Taq* DNA polymerase (Gibco, BRL). The reaction mixtures were overlaid with mineral oil. Amplification was carried out in 96-well plates using a MJ Research thermal cycler (PTC-100) with the following programme: initial denaturation step at 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 36°C, 2 min at 72°C and a final elongation at 72°C for 10 min. Amplification products (10 μ l) were separated by electrophoresis at 5V.cm⁻¹ in 1.3% agarose gels for 4 h in 0.5 x TBE buffer (Tris base 0.045 M, Boric acid 0.045 M and EDTA 1 mM) and stained for 30 min in ethidium bromide (0.5 g.ml⁻¹). Gels were photographed under UV light.

II. 4. Data analyses

II. 4. 1. RAPDs polymorphism

Reproducible and polymorphic RAPD fragments were scored as present (1) or absent (0) and a binary data matrix was constructed.

Fragment frequencies were calculated for each studied population and a Fisher exact test was applied to determinate the number of informative fragments, i.e. the number of fragments which showed significantly different frequencies between two populations or two groups of populations.

II. 4. 2. Phenotypic analysis

We firstly used phenotypic methods, based on banding pattern of each individual (1/0 matrix).

A factorial correspondence analysis (FCA) based on the Chi-2 distance and especially adapted for qualitative data, was used to obtain synthetic pictures of molecular variation. (ADE-4 programme, Thioulouse *et al.* 1997).

In addition, we conducted an analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) to gain some insight into how variability was organised at the population and group levels. This method is based on used classical variance analysis on the matrix of inter-individual genetic distances (Euclidean metric distance) generated from pair wise comparisons of all individuals. The variation is partitioned among individuals/within populations, among populations/within groups and among groups. Significance level for variance components estimates was computed by non-parametric permutational procedures with 500 permutations.

Table 2: Number of fragments showing significant differences of frequency (Fisher exact test) between all pair-wise combinations of the 8 populations studied. Upper the diagonal, number of fragments for which F value is greater than 10⁻³, and below (Bold number) number of fragments for which F value is greater than 10⁻⁵.

Populations ^a	CHFR	KERT	STRA	GRVO	BORE	SFOY	SLAU	RACH
CHFR	*	11	9	7	24	14	12	25
KERT	2	*	17	11	32	25	20	35
STRA	2	1	*	13	34	18	13	23
GRVO	1	0	2	*	24	19	13	22
BORE	8	12	8	6	*	22	25	25
SFOY	2	4	4	1	7	*	5	23
SLAU	2	4	1	2	5	0	*	24
RACH	6	9	8	4	13	6	4	*

^a See population code in Table 1

Table 3: Analysis and nested analysis of Molecular Variance (AMOVA) from 8 populations of *Picea abies* classified in 4 groups (Vosges, Alps/Jura, Southern Alps, seed orchard).

Sources of variation	d.f.	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P value
<i>Analysis among populations</i>						
Among populations	7	565.61	80.80	2.039	10.37	<0.002
Within populations	240	4227.97	17.62	17.617	89.63	<0.002
<i>Analysis among groups</i>						
Among groups	3	378.47	126.16	1.989	9.90	<0.002
Within groups	244	4415.11	18.09	18.095	90.10	<0.002
<i>Nested analysis</i>						
Between groups	3	378.47	126.16	1.455	7.27	<0.002
Between populations within groups	4	187.14	46.79	0.946	4.72	<0.002
Within populations	240	4227.97	17.62	17.616	88.01	<0.002

d.f., Degrees of freedom; SSD, Sum of squared deviations; MSD, Mean Squared deviations; P value, Significance of the variance components

II. 4. 3. Genotypic analysis

Several specific difficulties make it controversial the use of RAPD markers in population genetic studies (Clark and Lanigan 1993; Lynch and Milligan 1994). Mainly, the dominant character of RAPD variation which precludes zygosity inference and direct estimation of alleles frequencies from fragments frequencies can induce bias in estimation genetic parameters. However, in *Picea abies* as in many conifers species, the primary assumption needed to estimate genetic diversity, has been verified in many populations using allozymes (Muona 1989; Lagercrantz and Ryman, 1990). Moreover, the recent analysis of a population included in this study (SFOY) did not show any significant departure (Konnert, personal communication).

Genetic diversity was also assessed within each population on the basis of average heterozygosities estimated from alleles frequency at each locus. For dominant markers such RAPDs, transformation of fragments frequency (phenotypic data) into alleles frequency (genotypic data) requires three main assumptions: (1) mendelian segregation of polymorphic fragments; (2) homology of same-size fragments between individuals, and (3) Hardy-Weinberg equilibrium within populations. We used the programme POPGENE 1.21 (Yeh *et al.* 1997) to estimate gene diversity (H_e) and F-statistics (H_s , H_t , G_{st}) following Nei (1973). These parameters were also computed only from fragments showing frequency inferior to $(1-3/N)$ in at least one population, (with N the effective size of the population sampled) as recommended by Lynch and Milligan (1994).

Finally, an unbiased genetic distance (Nei 1978) was computed among populations and subjected to the UPGMA method of clustering (Sneath and Sokal 1973).

III. Results

III. 1. RAPDs polymorphism

A total of 109 RAPD fragments produced by 24 primers were scored on the basis of their reproducibility and their polymorphism among the 152 analysed trees. The numbers of significantly different fragments between all pair-wise combination of populations are given in Table 2. When we applied the criterion $F \leq 10^{-3}$, these number ranged from 5 between SLAU and SFOY to 35 between KERT and RACH, with a mean of 19 and a total of 87/109. The greater number of discriminating fragments was observed for RACH and BORE. When we applied the criterion $F \leq 10^{-5}$, the total number of significantly different markers was reduced (38/109). However the greater number of discriminating fragments was still observed in the RACH and BORE populations. Interestingly, few fragments (data not shown) exhibited frequency specific to a population, i.e., if they were common in a population they were rare in all other populations and *vice versa*. Six of these frequency specific fragments were found in the Southern Alps

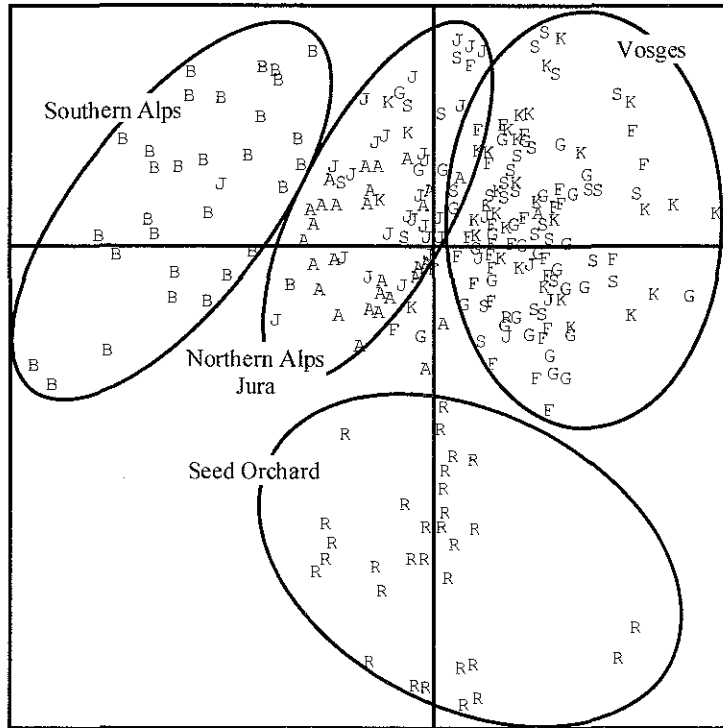


Fig. 2 Distribution of the 152 trees (8 populations) in the plane (1,2) of the factorial correspondence analysis computed from 109 polymorphic RAPD fragments.

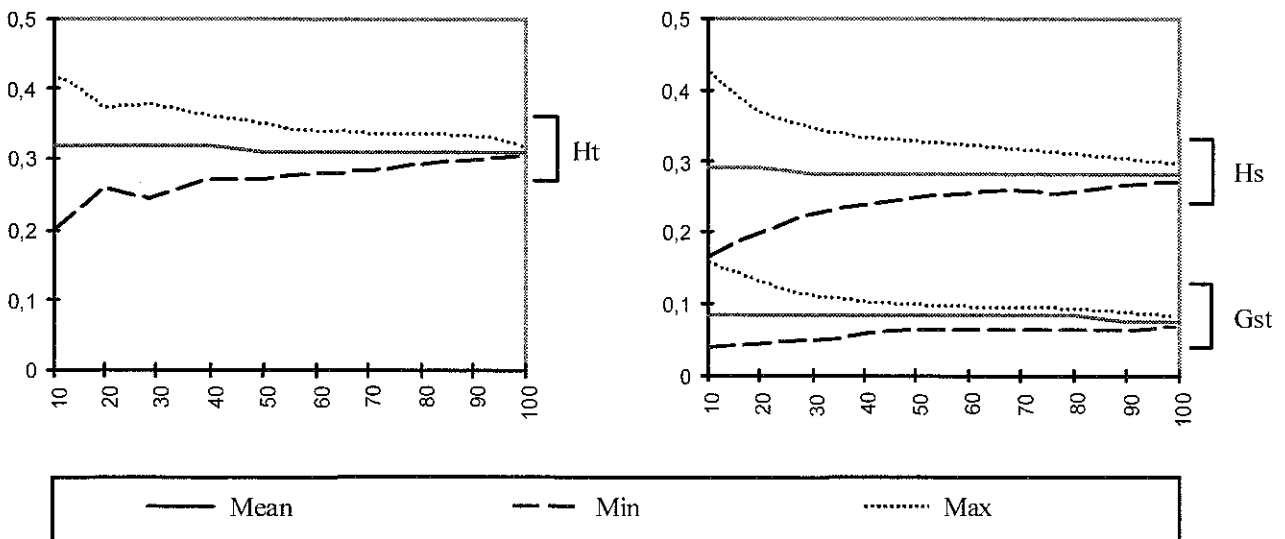


Fig. 3 Influence of the number of loci analysed on the gene diversity parameters Hs, Ht and Gst. Mean, Minimal and Maximal values was obtained on 100 random sampling of 10 to 100 loci among 109 initially scored.

population (BORE), 3 in the seed orchard (RACH), 2 in KERT, 1 in CHFR and STRA, 0 in GRVO population.

When we applied the Lynch and Milligan (1993) recommendation for RAPD genotypic analysis, the number of discriminating fragments was 80. Among the fragments left, 12 discriminated the populations with the criterion $F \leq 10^{-5}$.

III. 2. Phenotypic analyses

III. 2. 1. Factorial correspondence analysis

The two first axes explained 8% of the total variation (Fig. 2). Four groups related to geographical origin were clearly distinct on the factorial plane. The first gathered the four Vosges populations, the second grouped the Jura and northern Alps populations, the third and the fourth consisted of the Southern Alps population and the seed orchard, respectively. Within groups 1 and 2 consisting of more than 2 populations, no subgroups could be visualised. The planted (CHFR) and the 3 autochthonous Vosges populations were completely mixed together.

III. 2. 2. AMOVA analysis

Table 3 shows the variance partitioning of the RAPD phenotypic distances at different levels (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992). 10.4% of the total variation accounted for among population differentiation and the remaining (89.6% of the total variance) could be attributed to variation within populations. Similar results were obtained when analysis was performed on the four groups revealed by the FCA. However, the two-level variance partitioning indicated that differentiation between groups is greater (7.3%) than differentiation between populations (4.7%).

III. 3. Genotypic analysis

Using the 109 polymorphic fragments, expected genetic diversity (H_e) within populations ranged from 0.263 in BORE to 0.299 in SLAU (Table 1) and averaged 0.287 (H_s). 91% of the total genetic diversity (H_t) was found within populations. Then, the proportion of the total diversity attributable to population differentiation (G_{st}) was 9% (Table 4). Using only fragments with frequencies inferior to $1-3/N$ as recommended by Lynch and Milligan (1994) and Isabel *et al.* (1995, 1999), expected heterozygosity (Table 1) and G_{st} were slightly inferior ($H_s = 0.245$ and $G_{st} = 5.9\%$) (Table 4).

The Vosges and Jura autochthonous populations exhibited the highest genetic diversity whatever the number of fragments retained for the estimation (109 or 80). Opposite estimates were found for CHFR populations according to the number of fragments used: H_e was similarly high to autochthonous Vosges populations when we used the 109 polymorphic fragments, and in

Table 4: Estimates of Nei's genetic diversity in eight populations of *Picea abies* from dominant RAPD markers

Fragments retained →	All polymorphic fragments (109)	Fragment with frequencies inferior to 1-3/N (80)
Ht	0.3152	0.2656
Hs	0.2868	0.2498
Gst	0.0899	0.0594

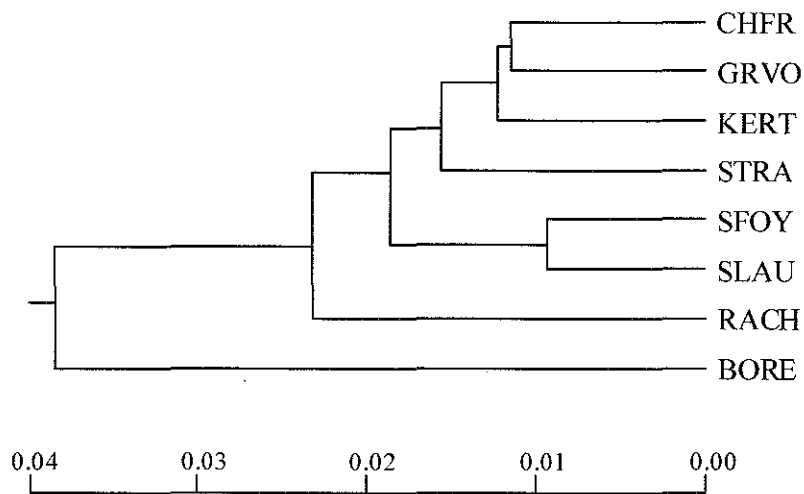


Fig. 4 UPGMA dendrogram based on unbiased genetic distances (Nei 1978) illustrating the relationships between the 8 French populations analysed.

contrast H_e was the lowest estimate among all populations when we used fragments (80) with frequencies inferior to $1-3/N$.

The influence of the number of analysed loci on the gene diversity parameters is shown in Fig. 3. Mean, maximal and minimal values of H_t , H_s and G_{st} were computed after 100 random resampling (with replacement) of 10 to 100 loci (by increment of 10 loci) among the initially 109 loci scored. Results showed that the gene diversity parameters were not significantly different ($p \leq 0.05$, t-test), when more than 40 random loci were analysed.

Informations obtained from UPGMA clustering of populations (Fig. 4) based on Nei's genetic distance (Nei, 1978) revealed many similarities with the conclusion of FCA. The Jura and northern Alps populations were grouped together and were more similar to Vosges material than to Southern Alps or seed orchard. It is noteworthy that the Southern Alps population was more genetically distant from other French populations than from seed orchard, which has been established from trees originating in the carpathian region.

IV. Discussion

IV. 1. Significance of RAPD analysis

The values of the genetic diversity parameters (H , G_{st}) obtained in this RAPD study are of the same magnitude than those previously estimated from allozymes data in *Picea abies* (Lagercrantz and Ryman 1990; Muona *et al* 1990; Giannini *et al.* 1991; Konnert 1991; Gömöry 1992; Müller-Starck 1995; Goncharenko *et al.* 1995; Krutovskii and Bergmann 1995; Lewandowski *et al.* 1997).

Several authors have underlined the fact that indirect estimation of allele frequencies resulting from the analysis of RAPD dominant fragments on diploid tissue can result in overestimated heterozygosity values in comparison with direct methods of genotype determination obtained from allozymes or RAPD markers applied to haploid megagametophytes. This has been demonstrately illustrated in *Picea mariana* (Isabel *et al.* 1995) and *Pinus strobus* (Isabel *et al.* 1999).

Nevertheless, this bias can be drastically reduced by excluding fragments exhibiting frequencies higher than $1-3/N$ (Lynch and Milligan 1994 ; Isabel *et al.* 1995, 1999), and by increasing the number of individual per population as well as the number of studied loci (Nei 1987).

Our resampling procedure confirmed that the number of loci retained is essential to obtain a good reliability of values. Indeed, we showed that the presence of putative non-Mendelian inherited fragments in a sampling test involving more than 40 fragments did not influence the results confirming Mendelian inheritance of most RAPD fragments as generally observed

in *Picea abies* (Williams *et al.* 1990; Carlson *et al.* 1991; Bucci and Menozzi 1993 ; Bucci and Menozzi 1995; Lu *et al.* 1995; Isabel *et al.* 1995; Heinze *et al.* 1996; Skov 1998). In addition, the results were no significantly different whether or not we exclude fragments with frequencies $> 1-3/N$, probably owing to the great number of analysed loci (>100). This give enough robustness to our estimates of genetic parameters, which can therefore be considered as unambiguous and representative of *Picea abies* populations.

IV. 2. Partitioning of genetic diversity

The results concerning the partitioning of genetic diversity were in accordance with the general observation that woody, perennial and outbreeding species maintain most of their variation within population (Hamrick *et al.* 1992). In *Picea abies*, the differentiation (G_{st}) commonly observed varies from 4 to 5% using allozymes. In our RAPD study, the G_{st} value (6%) estimated using only fragments with frequencies inferior to $1-3/N$ appeared to be slightly higher ($G_{st} = 9\%$ considering all polymorphic fragments). These values of among population differentiation based on alleles estimation have been confirmed by the AMOVA analysis (10%) which takes base on haplotypic data. This increased level of differentiation could be attributed to non Mendelian inheritance of some fragments (cytoplasmic origin) or to fragments under stronger balancing selection. In addition, the two levels AMOVA revealed that differentiation among populations is partly due to the geographical distance between the analysed populations, the greater differentiation being observed between the Vosges, the Alps/Jura, the southern Alps, and the seed-orchard groups. The distance analyses between populations using either alleles frequencies (UPGMA, Nei's unbiased distances, 1978) or banding pattern (factorial correspondence analysis) also revealed the same 4 groups of populations. These results are concordant with previous works using RAPD markers (Collignon and Favre 2000), in which the French area have been divided into 3 major groups, Vosges, Jura/Northern Alps, Southern Alps, clearly related with the chronological appearance of the pollen of *Picea abies* at the western margin of this natural area (De Beaulieu 1977, De Beaulieu *et al.* 1993 ; Wegmüller 1977).

IV. 3. Variation within populations

No significant differences between within-population values of genetic diversity have been observed. Surprisingly, genetic diversity estimates in the planted populations (CHFR) was found to be similar to that encountered in the autochtonous populations of the Vosges massif (KERT, STRA and GRVO).

However, considering the seed-orchard population (RACH), the observed genetic diversity indices exhibited lower value than expected. Indeed, these trees are issued from one carpathian population close to one ancient glacial refuge, in which variability is generally higher than in the remaining area (Dumolin-Lapègue *et al.* 1997). In addition, it has been shown in previous studies

assessing impact of phenotypic selection that seed orchard populations maintain levels of genetic diversity that are similar or greater than those found in their original populations (Bergmann and Ruetz 1991 ; El-Kassaby and Ritland 1996; Williams *et al.* 1995; Stoehr and El-Kassaby 1997).

In the case of the analysed seed orchard several causes can explained the results. The first would be the lack of difference in genetic diversity between glacial refugial zones and the periphery of the natural area. An other alternative might be that the genetic diversity has been noticeably altered within the seed orchard in comparison with the original population. Such a situation has already been observed for artificially established populations in Slovakia (Gömöry 1992). The restricted number of maternal trees from which the cones have been collected could be the main cause.

In the analysed Vosges populations all collected trees were aged more than 200 years old, and thus probably germinated prior to the beginning of the massive plantations made in these mountains. So, these populations certainly grew from natural regeneration, free from allochthonous introgression. Our results show that the three autochthonous populations are genetically distant from other French neighbouring populations (SLAU, Jura massif) and maintain a high level of genetic diversity (quite similar to northern Alps and Jura populations). The maintain of high level of genetic diversity in these small isolated populations, potentially submitted to genetic drift, could be the result of gene flows coming from the Forêt-Noire or Jura mountains only distant from 75 to 100km in east or south-east direction, respectively. In this case an increase of genetic diversity can be expected in the next generation, due to intensive introgression from surrounding plantations. The study of trees from recent regeneration could help to elucidate this major point. The allochthonous population (CHFR) composed of 150 year-old trees has been planted from material of unknown origin. Considering the genetic distances, the plants used to constitute this population have been probably not collected in the Jura or French Alps massifs. They have been most likely collected among autochthonous local populations, the only one available at this period throughout the Vosges mountains. All the information collected in our study could be useful to appreciate the distribution of the genetic variation and to provide a scientific basis for conservation of genetic resources.

V. References

- Arbez M (1994).** Fondement et organisation des réseaux européens de conservations des ressources génétiques forestières. *Gent Sel Evol* 26 : 301s-314s
- Beaulieu de JL (1977).** Contribution pollenanalytique à l'histoire tardiglaciaire et holocène de la végétation des Alpes méridionales françaises. PhD thesis, University of Aix-Marseille III
- Beaulieu JL De, Kostenzer J, Reich K (1993).** Dynamique forestière holocène dans la haute vallée de l'Arve (Haute Savoie) et migrations de *Abies* et *Picea* dans les Alpes occidentales. *Dissert Bot* 196 : 387-398

- Bergmann F, Ruetz W (1991).** Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. *For Ecol Manag* 46 : 39-47
- Binelli G, Bucci G (1994).** A genetic linkage map of *Picea abies* Karst., based on RAPD markers, as a tool in population genetics. *Theor Appl Genet* 88 : 283-288
- Bouvarel P et Jacamon M (1959).** Les Epicéas remarquables du Kertoff. *Bull Soc Bot Fr* 106 : 128-130
- Bouvarel P (1961).** Observation sur la date de l'aouêtement de quelques provenances françaises d'Epicéa. *Annales Nationale des Eaux et Forêt et de la Station de Recherche et Expérience* 18 : 99-129
- Bucci G, Menozzi P (1993).** Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. *Mol Ecol* 2: 227-232
- Bucci G, Menozzi P (1995).** Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst. population. *Heredity* 75 : 188-197
- Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C, Rutledge R (1991).** Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet* 83 : 194-200
- Castiglione S, Wang G, Damiani G, Bandi C, Bisoffi S, Sala F (1993).** RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. *Theor Appl Genet* 87 : 54-59
- Clark A, Lanigan CMS (1993).** Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Mol Biol Evol* 10 : 1096-1111
- Collignon AM, Favre JM (2000).** Contribution to the postglacial history at the western margin of *Picea abies*' natural area using RAPD markers. *Ann Bot* 85 : 713-722
- Dawson IK, Powell W (1999).** Genetic variation in the Afromontane tree *Prunus africana*, an endangered medicinal species. *Mol Ecol* 8 : 151-156
- Doyle JJ, Doyle JL (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19 : 11-15
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corre V, Petit RJ (1997).** Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146 : 1475-1487.
- El-Kassaby YA, Ritland K (1996).** Impact of selection and breeding on the genetic diversity in Douglas-fir. *Biodiversity and Conservation* 5 : 795-813
- 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
- Fourré JL, Bergre P, Niquet L, André P (1997).** Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce : morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor Appl Genet* 94 : 159-169
- Geburek T (1997).** Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest trees. *Biodiversity and Conservation* 6 : 1639-1654
- Giannini R, Morgante M, Vendramin GG (1991).** Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genet* 40 : 160-166

- Gillies ACM, Cornelius JP, Newton AC, Navarro C, Hernandez M, Wilson J (1997).** Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Mol Ecol* 6 : 1133-1145
- Gömöry D (1992).** Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *For Ecol Manag* 54 : 215-223
- Goncharenko GG, Zadeika IV, Birgelis JJ (1995).** Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in natural populations of Latvia. *For Ecol Manag* 72 : 31-38
- Gravenhorst G (1991).** Genetic variation in forest tree populations: the view point of bioclimatologist on genetic variation of forest trees. In: Genetic variation in European population of forest trees (Müller Starck F, Ziehe M, eds). Sauerlander's Verlag, Frankfurt am Main, 2-19
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992).** Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For* 6 : 95-124
- Heinze B, Westcott R, Schmidt J, Glössl J (1996).** Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect genetic variation in Norway spruce. *New For* 11 : 173-184
- Hurme P, Savolainen O (1999).** Comparison of homology and linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers between individual trees of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Mol Ecol* 8 : 15-22
- Isabel N, Tremblay L, Michaud M, Tremblay FM, Bousquet J (1993).** RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theor Appl Genet* 86 : 81-87
- Isabel N, Beaulieu J, Thériault P, Bousquet J (1999).** Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Mol Ecol* 8 : 477-483
- Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J (1995).** Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in Black spruce. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 6369-6373
- Kalis AJ (1984).** L'indigénat de l'Epicéa dans les Hautes Vosges. *Revue de Paléobiologie de Genève* Vol sp Avril : 103-115
- Khasa PD, Dancik BP (1996).** Rapid identification of white Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theor Appl Genet* 92 : 46-52
- Konnert M (1991).** Die Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) im Schwarzwald: Genetische Variation und Korrelationen. *Fortwissenschaftliches Centrablatt* 110 : 84-94.
- Krutovskii KV, Bergmann F (1995).** Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity* 74 : 464-480.
- Lacaze JF (1969).** Etude de la variabilité infraspécifique de l'Epicéa (*Picea abies* Karst.). Provenances françaises et polonaises. Résultats au stade juvénile. *Ann Sci For* 26 : 345-396
- Lacaze JF (1970).** Analyse d'une expérience multi-stationnelle de provenances d'Epicéa (*Picea abies* Karst.). *Ann Sci For* 27 : 5-37
- Lagercrantz U, Ryman N (1990).** Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* 44 : 38-53.

- Lecorre V, Dumolin-Lapègue S, Kremer A (1997).** Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. : the role of history and geography. *Mol Ecol* 6 : 519-529
- Ledig FT. 1992.** Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63 : 87-108
- Lewandowski A, Burczyk J, Chalupka W (1997).** Preliminary results on allozyme diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Poland based on plus tree investigations. *Act Soc Bot Pol* 66: 197-200
- Lu MZ, Szmidt AE, Wang XR (1995).** Inheritance of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.) *Heredity* 74 : 582-589
- Lynch M, Milligan BG (1994).** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3 : 91-99
- Müller-Starck G (1995).** Genetic variation in high elevated populations of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in Switzerland. *Silvae Genetica* 44 : 356-362
- Muona O, Paule L, Szmidt AE, Kärkkäinen K (1990).** Mating system analysis in a central and northern European population of *Picea abies*. *Scand J For Res* 5 : 97-102
- Muona O (1989).** Population genetics in forest tree improvement. In: Brown ADH, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds) *Plant population genetics, breeding and resources*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Nei M (1973).** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70 : 3321-3323
- Nei M (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89 : 583-590
- Nei M (1987).** *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press, New York.
- Palacios C, Gonzalez-Candelas (1997).** Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Mol Ecol* 6 : 1107-1121
- Perrin H (1964).** *Sylviculture, tome 2 : Le traitement des forêts, théorie et pratique des techniques sylvicoles*. Edition ENGREF, Nancy.
- Perron M, Bousquet J (1997).** Natural hybridization between black spruce and red spruce. *Mol Ecol* 6 : 725-734
- Peters RL (1990).** Effects of global warming on forests. *For Ecol Manag* 35 : 13-33
- Scheepers D, Eloy MC, Briquet M (1997).** Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theor Appl Genet* 94 : 480-485
- Skov E (1998).** Mendelian inheritance and tissue expression of RAPD-markers in *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae genet* 47 : 262-270
- Sneath PHA, Sokal RR (1973).** *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. Freeman WH and Co, San Francisco.
- Stoehr MU, El-Kassaby YA (1997).** Levels of genetic diversity at different stages of the domestication cycle of interior spruce in British Columbia. *Theor Appl Genet* 94 : 83-90
- Szmidt AE, Wang XR, Lu MZ (1996).** Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76 : 412-420

- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S, Olivier JP (1997).** ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing* 7 : 75-83
- Tondon J (1992).** Inventaire des pessières naturelles (*Picea abies*) du massif vosgien. Mastère Sciences Forestière ENGREF.
- Van de Ven WTG, McNicol RJ (1995).** The use of RAPD markers for the identification of sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity* 75 : 126-132
- Wegmüller S (1977).** Pollenanalytische Untersuchungen zur Spät- und postglazialen Vegetationsgeschichte der französischen Alpen (Dauphiné). Haupt, Bern.
- Welsh J, McClelland M (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18 : 7213-7218
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 : 6531-6535
- Williams CG, Hamrick JL, Lewis PO (1995).** Multiple-population versus hierarchical conifer breeding programs: a comparison of genetic diversity levels. *Theor Appl Genet* 90 : 584-594
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T, Mao JX (1997).** POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Ziehe M (1987).** Gene resources and gene conservation in forest trees: General concept. In: Genetic effects of pollutants in forest tree populations. Proc IUFRO Springer-Verlag, 173-185.

Conclusion

Les niveaux de diversité obtenus ici à l'aide de marqueurs RAPD ne sont pas significativement variables entre des populations analysées, qu'elles soient autochtones ou allochtones. En outre, ils sont du même ordre que ceux cités par d'autres auteurs ayant utilisés des isozymes.

L'étude des variations à l'échelle intrapopulation confirme les résultats obtenus au niveau des provenances françaises (Chapitre 3). Les populations du Jura et des Alpes du nord sont très proches, mais la population des Alpes du Sud se distingue des autres. Ce résultat est à mettre en relation d'une part avec l'apparition de pollen très précoce dans cette région, c'est-à-dire bien avant l'extension de l'Epicéa dans les Alpes du Nord, et d'autre part avec les capacités d'adaptation à la sécheresse particulières aux populations des régions du sud. L'hypothèse d'un refuge supplémentaire dans le sud-ouest de l'Europe n'en est que renforcée.

L'analyse de la population verger-à-graines (Rachovo) introduite à titre de référence, et provenant de l'Est des Carpathes, démontre également que la distance géographique a une incidence qualitative sur la variation moléculaire de l'Epicéa

Les populations autochtones des Vosges ont des indices de diversité similaires aux autres populations de l'aire française, et ceci malgré l'isolement du massif vosgien et la dispersion des populations au sein du massif. Ce constat pourrait laisser penser à une forte introgression en provenance des plantations environnantes. Les prélèvements ont été cependant réalisés sur des individus suffisamment âgés pour que le risque en soit minime. Il est sans doute plus probable que cette diversité relativement importante résulte des flux extérieurs de graines d'abord et de pollen.

Les distances génétiques entre les populations du Jura et les Vosges étant supérieures à celle obtenue entre le Jura et les Alpes, on doit envisager que le flux de pollen ayant atteint et atteignant peut-être encore les Vosges ne soit pas seulement issu du Jura mais aussi de la Forêt-Noire.

La population allochtone, sans doute issue d'une des toutes premières plantations effectuées dans le massif Vosges est très proche génétiquement des autres populations autochtones du massif. Il est donc probable qu'elle ait été réalisée à partir de matériel local, le seul disponible, à proximité, à cette époque.

Conclusion générale et perspectives

L'étude des variations moléculaires réalisée à l'aide des marqueurs RAPD nous a permis d'apporter un certain nombre d'éléments d'information sur la structuration géographique des variations génétiques chez l'Epicéa commun à l'échelle de son aire de distribution naturelle, puis plus particulièrement à la limite ouest de celle-ci.

1- Au niveau de l'aire naturelle totale, nous avons mis en évidence deux groupes génétiquement éloignés. L'un regroupe l'ensemble des provenances du domaine baltico-nordique et l'autre les provenances de l'Europe centrale (domaines hercyno-carpathique et alpin). Une telle différenciation, difficile à mettre en évidence entre des espèces proches, est encore plus rarement observée entre des groupes de provenances au sein d'une même espèce. Selon toute vraisemblance, elle est le résultat d'événements survenus au cours des périodes glaciaires et/ou postglaciaires. Il est probable, comme plusieurs autres auteurs l'ont parfois évoqué, que la zone refuge située dans la plaine de Moscou et celles situées plus au Sud dans les Carpathes et les Alpes dinariques, n'ont eu aucun contact pendant une période de temps suffisamment longue pour que les Epicéas issus de chacune de ces zones soient aujourd'hui encore très différents. Cette hypothèse est d'autant plus probable que l'examen que nous avons réalisé, sur le même dispositif expérimental, de caractères quantitatifs tels que hauteur, circonférence, débourrement, mortalité ou qualité du bois des arbres aboutit à la même différenciation.

Parmi l'ensemble des marqueurs RAPD analysés, certains sont spécifiques des provenances baltico-nordiques. Récemment certains auteurs ont révélé une différenciation analogue à celle que nous avons décrite en utilisant soit des marqueurs mitochondriaux (Sperisen *et al.* 1998) qui chez l'Epicéa sont à transmission maternelle (Grivet *et al.* 1999), soit des marqueurs chloroplastiques (Vendramin *et al.* 2000) qui sont à hérédité paternelle. Ces marqueurs en raison de leur origine sont très précieux en phylogéographie mais ils demeurent encore peu nombreux. Nous pensons que certains de nos fragments spécifiques pourraient être issus de ces organites et permettraient ainsi d'augmenter le nombre de marqueurs disponibles actuellement.

Au sein du domaine baltico-nordique, nous avons révélé un fort gradient latitudinal. Parmi les hypothèses que nous avons émises, la plus probable est que la zone refuge de la plaine de Moscou soit en fait, constituée de plusieurs refuges disposés latitudinalement et que la recolonisation vers l'ouest se soit produite, indépendamment, à partir de plusieurs de ceux-ci. Un échantillonnage plus fin au niveau de la région de Moscou permettrait de confirmer ou non cette hypothèse.

Au niveau du groupe de l'Europe centrale, les différentes provenances analysées sont moléculairement très proches, ce qui suggère des contacts précoces entre les populations issues des refuges carpathique et alpin, pendant les glaciations, ou au cours du processus de recolonisation. Un gradient longitudinal modéré à néanmoins pu être mis en évidence et

confirmer ainsi que les variations moléculaires observées sont en accord avec l'hypothèse d'un mouvement de l'Epicéa vers l'ouest après les dernières glaciations.

Les provenances de chacun des deux domaines d'Europe centrale se distinguent cependant par une structuration légèrement différente : le gradient longitudinal est en effet plus marqué dans le domaine hercyno-carpathique. Cette différence peut être due à la structure géomorphologique plus complexe de l'arc alpin, mais aussi à l'existence de refuges glaciaires supplémentaires situés dans le Sud de l'Europe. Les provenances localisées en ex-Yougoslavie, en Bulgarie, en Italie et dans le sud de la France se différencient en effet des autres par leurs caractères quantitatifs. Il faut souligner cependant que ces provenances du sud de l'aire sont sous-représentées dans le dispositif expérimental utilisé. Ces régions ayant accueilli bien d'autres espèces forestières au cours des glaciations mériteraient d'être mieux échantillonnées. Bien que l'analyse des pollens n'ait pas permis de détecter la présence de refuges majeurs dans ces régions, des refuges moins importants et non détectables jusqu'à présent, pourraient avoir joué un rôle déterminant dans la recolonisation du sud de l'Europe par l'Epicéa.

2- L'étude des variations à la périphérie ouest de l'aire naturelle de distribution a, dans un premier temps, confirmé la migration est-ouest de l'Epicéa après la dernière glaciation. Au sein des provenances françaises, trois groupes ont été mis en évidence. Le premier, très hétérogène, comporte des provenances vosgiennes qui se mêlent à la fois aux provenances du Jura et d'Europe centrale. Le second groupe réunit les provenances du Jura et des Alpes du Nord. Enfin, le troisième contient uniquement les provenances des Alpes du Sud.

La forte hétérogénéité des provenances vosgiennes est surprenante dans la mesure où ces populations sont assez isolées les unes des autres, et où le massif des Vosges, contrairement au Jura et aux Alpes, est lui-même séparé d'une centaine de kilomètres des autres massifs abritant des populations naturelles d'Epicéa. On peut donc penser que ces populations largement dispersées au milieu de peuplements introduits ont été introgressées. La forte hétérogénéité des provenances vosgiennes pourrait également résulter de flux migratoires venant des montagnes les plus proches : le Jura et/ou la Forêt-Noire. La proximité des relations génétiques entre certaines provenances vosgiennes et les provenances du Jura confirmerait cette dernière hypothèse. Concernant la Forêt-Noire, aucune population autochtone n'a pu être analysée. Largement replantée depuis plus de 200 ans (Schmidt-Vogt 1976), ces populations sont très rares et selon certaines sources auraient même totalement disparu. Leur analyse permettraient pourtant d'apporter des éléments importants pour élucider l'origine des Epicéas vosgiens.

Les provenances du Jura sont proches de celles des préalpes du Nord (Chamonix, Châtel...), mais encore plus proches de celles des Alpes de l'ouest (Grande-Chartreuse, Autrans...). Ces relations correspondent tout à fait à l'ordre d'apparition des pollens en France, qui sont signalés dès 5000 BP dans le Jura, dès 3500 BP en Grande Chartreuse, et dès 3000 BP dans les préalpes du Nord (De Beaulieu *et al.* 1993, 1994).

Les provenances des Alpes du Sud sont très différentes des autres provenances françaises. Certains marqueurs rares dans les massifs du Jura, des Alpes du Nord et des Vosges y sont très fréquents. Comme dans le cas des marqueurs spécifiques des provenances du domaine baltico-nordique, il serait judicieux d'en déterminer l'origine génomique (nucléaire, chloroplastique ou mitochondriale). Cette différenciation peut paraître surprenante mais elle est cohérente avec les observations polliniques indiquant que l'Epicéa est arrivé dans cette région bien avant son apparition dans le reste des Alpes françaises (De Beaulieu 1994). Nos résultats suggèrent donc l'existence de voies migratoires supplémentaires à celles largement acceptées traversant les Alpes suisses, le Jura puis les Alpes françaises. On peut en effet imaginer, qu'il y ait eu un refuge dans le Sud des Alpes françaises, ou bien que l'Epicéa soit parvenu dans cette région via l'Italie en longeant la mer Méditerranée comme cela a été suggéré pour d'autres espèces telles que le Chêne, le Sapin, le Pin... Plusieurs auteurs Italiens (Ferrarini 1977 ; Borghetti *et al.* 1988 ; Giannini *et al.* 1991) ont d'ailleurs émis l'hypothèse d'un refuge toscan situé dans le nord de la chaîne des Apennins. L'analyse de provenances autochtones de ces régions permettrait de tester l'éventualité d'une filiation avec les provenances françaises des Alpes du Sud.

3- L'analyse présentée dans la dernière partie, a été réalisée à partir de populations et non plus à partir d'un ensemble de provenances. Il a été ainsi possible d'évaluer le niveau d'hétérozygotie des populations françaises et de le comparer aux données obtenues à l'aide d'isozymes. Dans ce domaine d'étude, les marqueurs RAPD sont souvent contestés en raison de leur dominance (Lynch et Milligan 1993). Le manque d'information qui en découle sur le génotype des individus analysés entraîne ainsi une surévaluation des paramètres génétiques calculés (Isabel *et al.* 1995, 1999). Nous nous sommes efforcés de limiter ces inconvénients en appliquant dans l'analyse des données les corrections de Lynch et Milligan (1993) et en augmentant considérablement le nombre de loci analysés. Dans ces conditions, il est intéressant de remarquer que nos résultats sont très comparables à ceux obtenus pour les mêmes populations à l'aide d'isozymes (voir tableau 3, introduction). Néanmoins, pour approfondir ces résultats il serait intéressant d'étudier pour l'une des populations analysées, par exemple le peuplement classé du Kertoff, un lot de graines issues de chacun des individus sélectionnés. Ceci permettrait d'étudier l'héritabilité d'un certain nombre de marqueurs et surtout de rétablir la co-dominance. Ces graines ont déjà été récoltées et sont stockées à 4°C au laboratoire.

Les populations analysées ont des niveaux de diversité similaires, qu'elles soient originaires des Vosges, du Jura et des Alpes, ou bien qu'elles soient autochtones ou introduites.

L'étude des variations moléculaires au sein des populations aboutit aux mêmes conclusions que précédemment. Les populations du Jura et des Alpes du Nord sont très proches alors que la population des Alpes du Sud est distante de toutes les autres. Les populations vosgiennes sont regroupées.

Concernant les populations vosgiennes, nous nous attendions à obtenir des niveaux de diversité plus faibles étant donné l'isolement du massif et la dispersion des populations en son sein. Or, ces populations maintiennent des niveaux de diversité élevés, équivalents à ceux des populations du Jura et des Alpes qui se trouvent situées au sein de larges peuplements continus. Il est peu probable que les phénomènes d'introggression par les plantations environnantes expliquent cette forte diversité, dans la mesure où nous avons soigneusement sélectionné des individus âgés de plus de 200 ans et présentant le port colonnaire typique de l'Epicéa autochtone vosgien et qui ont donc germé avant ou au moment des toutes premières plantations. La conservation de cette diversité est plus probablement le résultat de flux polliniques continus entre les Vosges et les massifs du Jura et de la Forêt-Noire.

Actuellement, les plantations environnantes peuvent introgresser ces populations vosgiennes autochtones et l'on doit alors s'attendre à une hausse de la diversité dans les prochaines générations. Il faudrait cependant vérifier qu'il n'existe aucun décalage phénologique entre ces populations autochtones que l'on sait très précoces (Vacher 1996) et les plantations. Une telle barrière à l'hybridation pourrait laisser espérer une meilleure conservation de ces individus au phénotype si particulier. L'analyse des régénérations devrait également permettre d'évaluer le degré d'introggression.

Dans la troisième partie, nous avons analysé une plantation vosgienne âgée de plus de 150 ans mais d'origine inconnue. Les variations moléculaires observées sont très proches de celles révélées dans les populations naturelles situées à quelques kilomètres seulement. Ainsi, il est très probable que cette population ait été plantée à partir de matériel local, les populations autochtones étant à l'époque les seules sources de graines disponibles à proximité. Dans les Vosges, il existe encore une multitude de plantations d'origine inconnue qui mériteraient d'être analysées afin d'en déterminer l'origine exacte.

Les populations autochtones vosgiennes sont constituées d'individus remarquables ayant un port colonnaire. L'analyse RAPD qui cribble "au hasard" des variations au sein du génome ne nous a pas permis de détecter de marqueurs liés à ce port. Cette recherche est d'autant plus délicate que ce port n'apparaît que sur des individus suffisamment âgés. Il est sans doute lié à un défaut de lignification des branches. Il serait donc peut-être plus efficace d'adopter une recherche ciblée et en commençant d'abord par l'analyse cellulaire du bois des branches pendantes responsable du port colonnaire, en poursuivant ensuite par l'analyse des variations au niveau des gènes impliqués.

Bibliographie

Beaulieu JL De, Kostenzer J, Reich K (1993). Dynamique forestière holocène dans la haute vallée de l'Arve (Haute Savoie) et migrations de *Abies* et *Picea* dans les Alpes occidentales. *Dissert Bot* 196 : 387-398

- Beaulieu JL De, Richard H, Ruffaldi P, Clerc J (1994).** History of vegetation, climate and human action in the French Alps and the Jura over the last 15,000 years. *Dissert Bot* 234 : 253-275
- Borghetti M, Giannini R, Menozzi P (1988).** Geographic variation in cones of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Silvae Genet* 37 : 178-184.
- Ferrarini E (1977).** Cenosi a *Picea abies* (L.) Karst. Relitte sull'Appennino. *Ann Acc Ital Sci For* 26 : 185-237
- Giannini R, Morgante M, Vendramin GG (1991).** Allozyme variation in Italian populations of *Picea abies* (L.) Karst. *Silvae Genet* 40 : 160-166
- Grivet D, Jeandroz S, Favre JM (1999).** Nad1 bic intron polymorphism reveals maternal inheritance of the mitochondrial genome in *Picea abies*. *Theor Appl Genet* 99 : 346-349
- Isabel I, Beaulieu J, Thériault P, Bousquet J (1999).** Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Mol Ecol* 8 : 477-483
- Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J (1995).** Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in Black spruce. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92 : 6369-6373.
- Kalis AJ (1984).** L'indigénat de l'Épicéa dans les Hautes Vosges. *Rev Paléobiol* vol sp Avril : 103-115
- Lynch M, Milligan BG (1994).** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3 : 91-99
- Schmidt-Vogt H (1976).** Fichtenherkünfte (*Picea abies* L. Karst.) der Bundesrepublik Deutschland. *Allg. Forst-u. J.-Ztg* 147 : 149-163
- Sperisen C, Büchler U, Matyas G (1998).** Genetic variation of mitochondrial DNA reveals subdivision of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). In *Molecular tools for screening biodiversity*, pp 413-417. Edité par Karp A, Isaac PG, Ingram DS. Chapman & Hall, London.
- Vacher V (1995).** Essai de comparaison du comportement des bourgeons d'arbres précoces et tardifs chez l'Épicéa commun (*Picea abies* L. Karst.). DEA de Biologie Forestière, Nancy I.
- Vendramin GG, Anzidei M, Madaghiele A, Sperisen C, Bucci G (2000).** Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* 43 : 68-78

EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

PROTOCOLE

- 1- Mettre au bain marie 65°C 10 ml de tampon CTAB, puis ajouter 100 µl de b-mercaptoéthanol. (tubes cylindroconiques)
- 2- Mettre le matériel de broyage (mortier, pilon, spatule) dans l'azote liquide. Congeler à l'azote liquide le matériel végétal (0,1 à 1g) puis broyer au mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.
- 3- Ajouter le broyat au tampon CTAB. Mélanger (inversion). Boucher le tube et laisser 45 min à 65°C en agitant de temps en temps.
- 4- Ajouter 10 ml de chloroforme/octanol (24:1). Mélanger (inversion).
- 5- Centrifuger 20 min à 3400 rpm (20°C).
- 6- Récupérer la phase aqueuse (supérieure), et répéter l'extraction en ajoutant de nouveau 10 ml de chloroforme/octanol (24:1).
- 7- Récupérer la phase aqueuse dans des tubes Corex 30 ml.
- 8- Ajouter 2/3 (v/v) d'isopropanol. Mélanger : l'ADN précipite. Laisser 15 à 30 min à température ambiante. Si le précipité semble absent, placer les tubes à -20°C.
- 9- Centrifuger 15 min à 9000 rpm (20°C).
- 10- Laver le culot avec 10ml de solution de lavage. Laisser 10 à 20 min à température ambiante.
- 11- Centrifuger 10 min à 9000 rpm (20°C).
- 12- Eliminer soigneusement le surnageant en laissant le culot adhérer à la paroi.
- 13- Reprendre le culot dans 0,75 ml de TE.
- 14- Transvaser dans un microtube (1,5ml), puis ajouter 10ml de RNase A (100ng/µl) et incubé 15 à 30 mn à 37°C.
- 15- Reprécipiter l'ADN. Diviser en 2 fractions (375 ml). Ajouter par tube (2 ml) 190ml d'acétate d'ammonium 7,5M et 1,2ml d'éthanol absolu. Laisser 30 min à température ambiante.
- 16- Centrifuger 15 mn à 16000 rpm (4°C).
- 17- Eliminer le surnageant. Rincer à l'éthanol 70%.
- 18- Centrifuger 15 mn à 16000 rpm (4°C).
- 19- Laisser sécher les culots, tubes renversés.
- 20- Reprendre les culots dans du TE' (200 ml) en plaçant les tubes à 65°C pendant 15 mn, bouchons ouverts.
- 21- Réunir les deux fractions et conserver à -20°C.

SOLUTIONS

Tampon CTAB

Tris HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	1,4 M
CTAB	2% (p/v)
EDTA 4 Na	20 mM
PVP 40 000	1% (p/v)

Tris HCl 1M pH 8,0	1 ml	10 ml	20 ml
NaCl	0,818 g	8,18 g	16,4 g
CTAB	0,2 g	2 g	4 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,4 ml	4 ml	8 ml
PVP 40 000	0,1 g	1 g	2 g
H ₂ O UP	qsp	10 ml	100 ml
			200 ml

Chloroforme/octanol (24:1)

Chloroforme	24 ml	48 ml	192 ml
Octanol	1 ml	2 ml	8 ml

Solution de lavage

Ethanol	76%
Acétate d'ammonium	10 mM

Ethanol absolu	70 ml	140 ml
Ac. NH ₄ 7,5 M	133 ml	266 ml
H ₂ O UP	qsp	100 ml
		200 ml

Tampons TE et TE'

	TE	TE'
Tris HCl 1M pH 8,0	1 ml (10 mM)	1 ml (10 mM)
EDTA 0,5 M pH 8,0	200 ml (1 mM)	20 ml (0,1 mM)
H ₂ O UP	qsp	100 ml
		100 ml

b-mercaptoéthanol
 Isopropanol
 RNase A (1 ng/ml)
 Acétate d'ammonium 7,5 M
 Ethanol absolu
 Ethanol 70%

MATÉRIEL

Cônes stériles
 Pipettes 10 ml stériles
 Tubes Eppendorf (1,5 ml) stériles
 Azote liquide
 Kimwipes
 Mortiers, pilons, spatules stériles
 Tubes cylindroconiques stériles
 Tubes corex 30 ml stériles

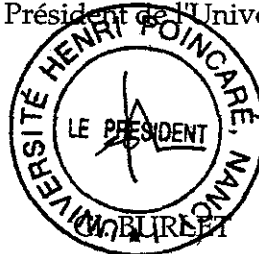
Madame COLLIGNON-TRONTIN Anne-Marie

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 4 décembre 2000 n° 467

Le Président de l'Université



Étude des variations moléculaires chez l'Épicéa commun (*Picea abies* (L.) Karst) à l'aide de marqueurs RAPD

Résumé - L'étude des variations moléculaires chez l'Épicéa commun à l'aide de marqueurs RAPD a été réalisée à trois échelles différentes : l'ensemble de l'aire naturelle, l'aire naturelle française et le massif vosgien.

A l'échelle de l'ensemble de l'aire naturelle on observe une nette différenciation entre les provenances baltico-nordiques et les provenances d'Europe centrale (domaines hercyno-carpathique et alpin). Cette différenciation est également révélée par l'analyse de caractères quantitatifs tels que hauteur, circonférence, qualité du bois, débourrement... A l'intérieur de ces deux groupes, des gradients géographiques ont pu être mis en évidence : un fort gradient latitudinal dans le groupe baltico-nordique et un gradient longitudinal modéré en Europe centrale. Ce gradient longitudinal est moins marqué au sein du domaine alpin. Ces résultats sont discutés en fonction de l'histoire glaciaire et postglaciaire de l'Épicéa en Europe établie sur la base de données écologiques et palynologiques.

A l'échelle de l'aire naturelle française, qui occupe la limite ouest de l'aire de distribution (domaine alpin), les résultats montrent que les provenances des Alpes du Sud se différencient clairement des autres, ce qui implique la probable participation de refuge(s) glaciaire(s) supplémentaire(s) situés dans le sud de l'Europe lors du processus de recolonisation. Parallèlement, on observe une forte similarité entre les provenances du Jura et du Nord des Alpes. Les provenances des Vosges apparaissent quant à elles assez hétérogènes. Les chemins conduisant à la recolonisation de ce massif sont discutés.

A l'échelle du massif vosgien, nos travaux ont permis de montrer que malgré l'isolement des populations, les indices de diversités sont élevés et similaires à d'autres populations françaises issues des Alpes et du Jura, autochtones ou allochtones.

Mots clés : *Picea abies*, phylogéographie, histoire postglaciaire, RAPD, variation moléculaire, diversité, Vosges

Molecular investigation of variations in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) using RAPD markers

Abstract - RAPD markers have been used to investigate molecular variations in Norway spruce at three different levels : the total natural distribution area, the French natural area and the Vosges massif.

At the total natural area level, we have obtained a clear differentiation between the baltico-nordic provenances (baltico-nordic domain) and the central Europe provenances (hercyno-carpathian and alpin domains). Such a differentiation is also revealed using quantitative traits such as height, girth, wood quality, bud burst... Within these two main groups geographical gradients have been detected : a strong latitudinal gradient within the baltico-nordic group and a moderate longitudinal gradient in central Europe. This longitudinal gradient is less marked within the alpine domain. The results are discussed in terms of glacial and postglacial history of *Picea abies* in Europe.

At the natural French area level, located at the western limit of natural area, the provenances of southern Alps have been clearly differentiated from the others involving the probable participation of additional glacial refuge(s) located in the south of Europe. In addition, we have observed a strong similarity between the Jura and north Alps provenances. The Vosges provenances appear fairly heterogeneous.

The Vosges and others French populations analyses have shown that the diversity indices estimated within Vosges isolated populations did not vary substantially.

Key words : *Picea abies*, phylogeography, postglacial history, RAPD, molecular variation, diversity, Vosges