

Structuration génétique et histoire phylogéographique de *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) dans les Pyrénées

Olivia Charrier^{1,2}, Pierre Dupont^{1,2}, André Pornon^{1,2}
& Nathalie Escaravage^{1,2}

1. Université Toulouse III Paul-Sabatier, Laboratoire Évolution & Diversité Biologique (EDB),
118 route de Narbonne, bâtiment 4R1, F-31062 Toulouse, France
2. CNRS, EDB, UMR 5174, F-31062 Toulouse, France
Auteur correspondant : andre.pornon@univ-tlse3.fr

RÉSUMÉ

La variation génétique chez les espèces végétales est déterminée par de nombreux facteurs (mode et système de reproduction, traits d'histoire de vie, événements climatiques). Dans les écosystèmes alpins, les changements abiotiques locaux peuvent induire des patrons d'adaptations génétiques complexes. Les Pyrénées s'étendent entre la Méditerranée et l'océan Atlantique, formant une barrière géographique aux migrations de nombreuses espèces. Les influences climatiques océaniques et méditerranéennes ont permis la formation de refuges glaciaires à basse altitude et de nunataks le long de la chaîne pyrénéenne. Afin d'étudier la structure génétique de *Rhododendron ferrugineum*, nous avons génotypé 645 individus des Pyrénées, des Alpes et du Jura à l'aide de 27 marqueurs microsatellites. Les résultats montrent une diversité génétique plus élevée dans les Alpes que dans les Pyrénées suggérant une migration nord/sud de cette espèce, avec une perte de diversité génétique lors des épisodes de colonisation. Dans les Pyrénées, cinq groupes génétiquement distincts ont été détectés. La forte diversité génétique dans certaines populations suggère la présence de refuges dans des zones de basse altitude à l'est et dans des nunataks et refuges de basse altitude au centre et à l'ouest de la chaîne des Pyrénées. Ces événements historiques expliquent la forte structuration génétique de *R. ferrugineum* à l'échelle des Pyrénées laquelle est maintenue par de faibles flux de gènes entre les populations.

Mots-clés : Ericaceae, marqueurs microsatellites, génétique des populations, routes de colonisation

Genetic structure and phylogeographical history of *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) in the Pyrenees

ABSTRACT

Genetic variation within plant species is determined by a number of factors (reproductive mode, breeding system, life history traits or climatic events). In alpine regions, plants experienced high abiotic heterogenic conditions that influence the population's genetic structure. The Pyrenees are a mountain range acting as a biogeographical barrier. Mediterranean and oceanic climatic influences allow the presence of nunataks or lowland unglaciated peripheral area along the Pyrenees. In order to investigate the genetic structure and phylogeographical history of *Rhododendron ferrugineum* across the Pyrenees, we used 27 microsatellite markers to genotype 645 individuals from the Pyrenees, Alps and Jura Mountain. Genetic diversity was higher in the Alps than in the Pyrenees suggesting colonization waves from the Alps to the Pyrenees. Pyrenean populations may have suffered from bottlenecks leading to a loss of genetic biodiversity. Two separate genetic lineages were found in the Alps and Pyrenees, with a substructure of five genetic clusters in the Pyrenees. The eastern populations showed the presence of rare alleles that can indicate the presence of alpine low land refugia. The clustering pattern at the central and western part of the Pyrenees and the high genetic diversity of certain populations suggest nunatak refugia along the chain. Moreover, the low gene flow among clusters may maintain the genetic differentiation of *R. ferrugineum*.

Key words: Ericaceae, microsatellite markers, population genetics, post-glacial colonization

**Estructuración genética e historia phylogeographical
de *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae)
a la escala de los Pirineos**

RESUMEN

La variación genética en las especies vegetales esta determinada por varios factores (sistema de reproducción, rasgos de historia de vida, eventos climáticos). En los ecosistemas alpinos, los cambios abióticos pueden inducir el ensamblaje de las adaptaciones genéticas complejas a una escala local. Los Pirineos forman una barrera geográfica a las migraciones de numerosas especies. Las influencias del clima oceánico y mediterráneo permitieron la formación de refugios glaciares y de nunataks. Con el objetivo de estudiar la estructura genética de *Rhododendron ferrugineum*, hemos genotipado individuos provenientes de 33 poblaciones de los Pirineos, Alpes y el Jura utilizando 27 microsateélites. Los resultados muestran una diversidad genética mas elevada en los Alpes que en los Pirineos, las poblaciones Pirenaicas sufren una pérdida de la diversidad genética durante la colonización. Las dos líneas genéticas encontradas en los Alpes estarían al origen de las dos principales líneas Pirenaicas. En los Pirineos, la segunda línea compone cuatro líneas genéticamente distintas. La fuerte diversidad genética en ciertas poblaciones sugiere la presencia de refugios en zonas de baja altitud (Pirineos orientales) y dentro de las nunataks en el centro y oeste de la cadena. Estos eventos históricos podrían explicar la fuerte estructuración genética de *R. ferrugineum* a la escala de los Pirineos la cual se mantiene por los bajos flujos de genes entre la poblaciones.

Palabras clave: Ericaceae, microsateélites, genética de poblaciones, vias de colonización

I. Introduction

Le maintien d'une diversité génétique élevée au sein d'une espèce est indispensable pour permettre son adaptation à des conditions environnementales changeantes (FRANKEL *et al.* 1995, FREEMAN & HERON 2007). Les prédictions actuelles suggèrent que les effets des changements climatiques seront les plus faibles au niveau des tropiques et les plus forts aux latitudes et altitudes élevées (KÖRNER 1999). Ainsi, les écosystèmes alpins, considérés comme des points chauds de biodiversité risquent d'être particulièrement menacés par les changements climatiques (KÖRNER 2003). Récemment, de nombreuses études ont montré un fort impact des pressions environnementales sur la diversité génétique des espèces (PAULS *et al.* 2013). Par conséquent, il semble indispensable d'étudier l'impact des changements climatiques passés sur la structure génétique actuelle d'une espèce (HAHN *et al.* 2012) afin d'en inférer les effets des changements futurs.

Chez les espèces végétales, la variation génétique est déterminée par de nombreux facteurs actuels ou passés agissant localement et à une large échelle spatiale. Dans les écosystèmes alpins, les changements abiotiques (topographie, température, enneigement, humidité ou composition du sol) le long de gradients altitudinaux et longitudinaux peuvent influencer les processus biologiques chez les plantes. Cela peut notamment induire des patrons d'adaptations génétiques complexes à une échelle locale. En plus des facteurs abiotiques, les traits d'histoire de vie d'une espèce peuvent influencer la structuration génétique. Par exemple, les espèces autogames ou clonales présentent généralement une plus faible diversité génétique et un plus fort degré de différenciation inter-populationnelles que les espèces allogames (HAMRICK & GODT 1996). Par ailleurs, les espèces ayant un système mixte de reproduction sexuée (auto et allogame) maintiennent un niveau élevé de diversité génétique, ce qui semble être avantageux pour les espèces végétales se développant dans les écosystèmes alpins (KÖRNER 2003). Les effets combinés

des traits d'histoire de vie et les conditions abiotiques hétérogènes à petite échelle peuvent induire une adaptation locale des espèces et une forte différenciation génétique entre les populations.

À une plus large échelle, les patrons génétiques des espèces sont influencés par les conditions climatiques passées (HEWITT 2000). Dans les régions tempérées, par exemple, l'aire de répartition des espèces a été modifiée au cours du Pléistocène lors de la succession de périodes glaciaires et interglaciaires. En montagne, les avancées et retraits périodiques des glaciers ont obligé les espèces à se déplacer vers des zones refuges de basse altitude ou à survivre dans des zones de haute altitude non englacées (nunataks). Les glaciations ont conduit à un isolement géographique et génétique de certaines populations suivi par des événements de fondations lors de la recolonisation des aires libérées des glaces, induisant une perte de diversité génétique de l'espèce (HEWITT 2000).

Les patrons génétiques et l'histoire phylogéographique de plusieurs espèces (STEHLIK *et al.* 2002, BYARS *et al.* 2009) ont été étudiés dans diverses régions de montagnes, mais jusqu'à maintenant peu d'études ont porté sur les Pyrénées (SEGARRA-MORAGUES *et al.* 2007, LAUGA *et al.* 2009, ESCARAVAGE *et al.* 2011). Situées au sud-ouest de l'Europe, les Pyrénées s'étendent le long d'un axe est-ouest entre la mer Méditerranée et l'océan Atlantique, et forment une barrière géographique aux migrations nord/sud de nombreuses espèces animales et végétales. Des études ont suggéré la présence de deux refuges principaux de basse altitude, l'un au sud-ouest et l'autre à l'est des Pyrénées sous influences climatiques océaniques et méditerranéennes respectivement (JEANNEL 1946, MÉDAIL & DIADEMA 2009, DZIALUCK *et al.* 2009). Par ailleurs, des données biologiques et géologiques démontrent que durant les périodes glaciaires, la calotte glaciaire ne couvrait pas complètement les hauts sommets et descendait rarement en dessous de 1 000 m d'altitude (JALUT *et al.* 1992). Il est donc possible que des zones nunataks aient été des refuges pour

certaines espèces de haute altitude (SEGARRA-MORAGUES *et al.* 2007). L'isolement des populations dans des zones refuges ainsi que la recolonisation des Pyrénées depuis celles-ci ont pu conduire à des patrons de structure génétique complexes à l'échelle du massif.

Nous avons étudié l'espèce subalpine, *Rhododendron ferrugineum* L., répandue dans les Alpes et les Pyrénées mais rare dans le Jura. *Rhododendron ferrugineum* est une espèce entomogame possédant un système mixte de reproduction sexuée (auto et allogamie). Afin d'étudier la structure génétique des populations de cette espèce, nous avons génotypé les individus de 33 populations (20 individus par population) des Pyrénées, des Alpes et du Jura à l'aide de 27 marqueurs microsatellites. Le but de cette étude est de comprendre quel est l'impact de l'histoire phylogéographique de cette espèce sur sa structure génétique actuelle. L'origine asiatique du genre *Rhododendron* (GOETSCH *et al.* 2005) implique une migration est-ouest de l'Asie vers l'Europe. En France, les populations alpines auraient migré vers les Pyrénées. Trois principales hypothèses peuvent être avancées quant à leur condition de survie dans les Pyrénées durant les différents épisodes glaciaires :

(Hyp. 1) L'espèce peut s'être réfugiée dans l'un des deux principaux refuges à l'est et au sud-ouest de la chaîne des Pyrénées. Dans cette hypothèse, on devrait observer une forte diversité génétique aux environs de ces deux zones refuges avec une érosion graduelle de la diversité génétique le long des routes de colonisation. En effet, les individus participant à la recolonisation d'un milieu ne représentent qu'une faible fraction de la diversité génétique présente dans les zones refuges (TABERLET *et al.* 1998).

(Hyp. 2) L'espèce peut avoir survécu dans des nunataks, zones refuges de haute altitude réparties le long de la chaîne pyrénéenne. Ces populations auraient subi de longues périodes d'isolement conduisant à une succession de groupes génétiquement bien différenciés mais ayant une faible diversité génétique intra-populationnelle.

(Hyp. 3) Une moindre différenciation entre groupes génétiques suggérerait que l'espèce a survécu dans de grands refuges de basse altitude permettant des flux de gènes importants. Lors des recolonisations à partir de ces zones refuges, il est possible que de petites populations possédant des allèles rares aient persisté à basse altitude.

II. Matériel et méthodes

1. Espèce d'intérêt

Rhododendron ferrugineum L. (Ericaceae) est un arbuste nain pouvant atteindre 80 cm de haut, sempervirent, à répartition subalpine. Cette espèce forme des landes localement très denses de 1 500 à 2 200 m d'altitude dans les Alpes et dans les Pyrénées, sur les faces nord à nord-ouest. Cette espèce est également retrouvée dans le nord des Apennins, dans les Alpes Apuanes et dans le Jura. Dans les Pyrénées, de petites populations isolées sont présentes entre 900 à 1 500 m d'altitude. *R. ferrugineum* est une espèce à floraison massive fleurissant de fin mai à fin juillet (en fonction de l'altitude) et pouvant produire plus de 3 000 fleurs rouges et nectarifères par m² (DELMAS *et al.* 2014). Des études antérieures ont montré

que, dans les Alpes, les fleurs sont protandres (grains de pollen matures avant le stigmate) et sont principalement pollinisées par des Hyménoptères du genre *Apis* et *Bombus* (ESCARAVAGE *et al.* 1997, ESCARAVAGE & WAGNER 2004). D'autres pollinisateurs tels que les Diptères et les Coléoptères sont des pollinisateurs secondaires. *Rhododendron ferrugineum* possède un système mixte de reproduction sexuée et peut également se multiplier végétativement par marcottage.

2. Sites étudiés et échantillonnage

Nous avons échantillonné 29 populations des Pyrénées, une du Jura et trois des Alpes situées entre 1 070 à 2 200 m d'altitude (Fig. 1). Les populations ont été séparées en trois groupes d'altitude : basse (de 1 000 à 1 450 m), intermédiaire (de 1 450 à 1 900 m) et haute altitude (de 1 900 à 2 200 m). Dans les Pyrénées, les populations ont été échantillonnées le long d'un transect longitudinal traversant trois régions : Languedoc-Roussillon (partie orientale des Pyrénées), Midi-Pyrénées (Pyrénées centrales) et Aquitaine (partie occidentale de la chaîne). Une estimation de la taille des populations est donnée dans le tableau 1 (<1 ha, 1-10 ha, 10-20 ha, 20-50 ha, 50-100 ha, >100 ha).

3. Extraction d'ADN et marqueurs microsatellites

Pour chacune des 33 populations, les jeunes feuilles de 20 individus (excepté pour les petites populations LapL et JuraL) ont été récoltées (645 individus au total), séchées dans du silica gel sur le terrain puis stockées à -20°C. Pour chaque individu, 20 mg de feuilles ont été broyées et l'ADN a été extrait à l'aide du DNeasy-Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Nous avons utilisé 27 marqueurs microsatellites nucléaires polymorphes développés par DELMAS *et al.* (2011) et CHARRIER *et al.* (2013) par pyroséquençage (454 FLX Titanium, Roche Applied Science, Meylan, France). Les amorces sens ont été marquées avec des fluorochromes (Eurofins MGW Operon, Courtaboeuf, France) et ont été multiplexées dans six PCR. La longueur des fragments a été lue sur un séquenceur ABI 3730 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) puis analysée avec le logiciel GENEMAPPER version 4.0.

4. Analyses des données

4.1. Diversité génétique

Des tests de clonalité ont été effectués pour tous les individus à l'aide du logiciel GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE 2006). La présence d'allèles nuls a été vérifiée avec le logiciel MICRO-CHECKER (VAN OOSTERHOUT *et al.* 2004) et l'écart à la loi de Hardy-Weinberg a été estimé grâce aux tests de Fischer (logiciel GENEPOP 3.4 ; RAYMOND & ROUSSET 1995). Nous avons utilisé le logiciel GenAlex 6.5 afin de calculer pour chaque locus et chaque population (Tableau 1) le nombre d'allèles, la richesse allélique (A_r), l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) et le coefficient de consanguinité (F_{IS}).

4.2. Différenciation et structure génétique des populations

Les valeurs de F_{ST} (niveau de différenciation génétique ; WEIR & COCKERMAN 1984) ont été calculées pour chaque paire de populations avec GENODIVE 2.0 (MEIRMANS & VAN TIENDEREN 2004). La significativité des valeurs obtenues a été

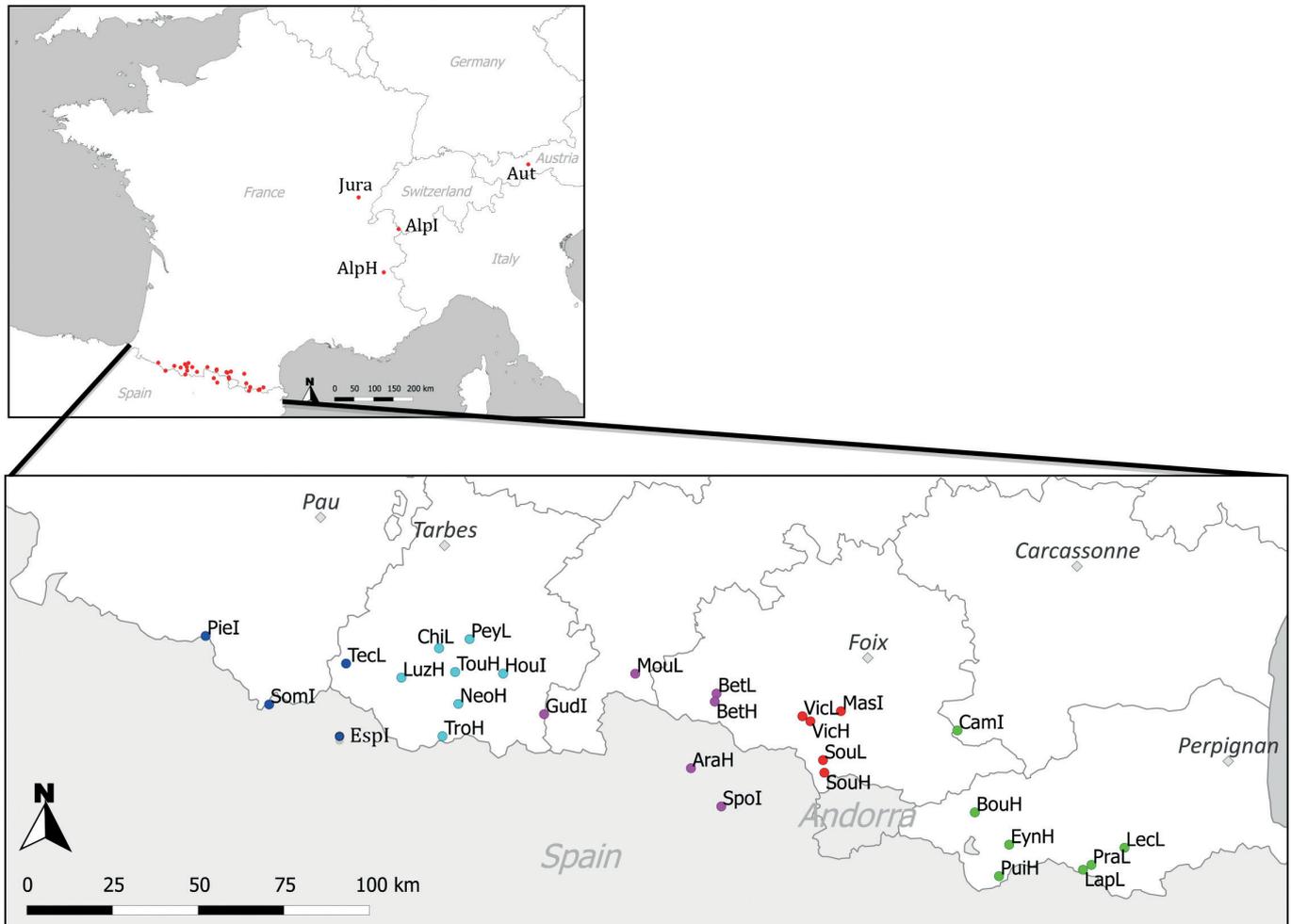


Fig. 1. En haut. Localisation des populations de *Rhododendron ferrugineum* échantillonnées dans les Alpes, Jura et Pyrénées. En bas. Carte détaillée des populations pyrénéennes (les couleurs correspondent aux cinq groupes génétiques).

vérifiée par un test de permutation (1 000 répétitions) avec le logiciel GENETIX 4.05 (BELKHIR *et al.* 2004).

Nous avons analysé la structuration génétique des populations avec le logiciel STRUCTURE (ver. 2.3.3 ; PRITCHARD *et al.* 2000). Le modèle avec introgression a été appliqué 50 fois pour chaque valeur de K (de 1 à 34).

III. Résultats

Pour les 645 individus, un total de 153 allèles est détecté à l'aide des 27 marqueurs microsatellites. Aucun clone n'est trouvé parmi les individus échantillonnés et la probabilité de présence d'allèles nuls est très faible. Parmi les 33 populations étudiées, 12 ne sont pas à l'équilibre de HW.

1. Diversité génétique et richesse allélique

Le nombre d'allèles varie de 2 à 15 en fonction des locus (6,25 allèles en moyenne). Seize allèles rares (allèle présent dans seulement une population) sont présents dans les populations AlpH (10 allèles), AutH (2 allèles), AlpI (1 allèle) et dans certaines populations pyrénéennes (TouH, PraL et LapL possédant chacune un allèle rare). La richesse allélique (Tableau 1) varie de 2 à 4,30 en fonction des sites. Les richesses alléliques les plus élevées sont observées dans les Alpes (AlpI = 3,70, AlpH = 4,30) et dans une des populations

les plus au sud des Pyrénées centrales (SpoI = 4,18), tandis que les plus faibles richesses alléliques sont trouvées à l'ouest de la chaîne des Pyrénées (PieI = 2,00, SomI = 2,26, EspI = 2,27) et dans les Pyrénées centrales (AraH = 2,26). Les valeurs moyennes de A_r , H_o et H_e atteignent 4,6, 0,37, 0,35 dans les Pyrénées et 5,2, 0,50 et 0,45 dans les Alpes. L'hétérozygotie attendue (H_e) et observée (H_o) varie de 0,20 à 0,59 et de 0,29 à 0,56 respectivement. Les valeurs les plus élevées de H_e sont observées dans les Alpes et dans le Jura (de 0,39 à 0,57) et dans certaines populations pyrénéennes (SpoI = 0,43 et NeoH = 0,44) alors que les valeurs les plus faibles sont dans les populations de l'est (LecL, PraL, AraH) et de l'ouest (EspI et PieI) des Pyrénées. Ces populations sont isolées et de petite taille (<1 ha) à l'exception de EspI (>100 ha). Un excès significatif d'hétérozygotes (FIS de -0,07 à -0,21) est détecté dans trois populations de l'est (LecL, PraL et PuiH) et dans quatre populations centrales (CamI, VicH, VicL, TecL). À l'inverse, un déficit significatif en hétérozygotes est trouvé dans quatre populations, avec des valeurs particulièrement élevées pour SomI (0,16) et EspI (0,31).

2. Différentiation et structuration génétique

Les valeurs de F_{ST} sont significativement différentes de zéro pour toutes les paires de populations excepté pour

Massif	Sites	Code des population	Coordonnées GPS	Taille des populations (ha)	Altitude (m)	n	Ar	Allèles Privés	HO	HE	FIS
Alpes	La Vornaine	AlpI	45°02'07"N 06°24'19"E	>100	1560	20	3.70	1	0.49	0.49	0.04
	Col du Lautaret	AlpH	46°00'08"N 06°57'18"E	5-10	2100	20	4.30	10	0.59	0.57	-0.01
	Parscherkofel	AutH	47°12'32"N 11°27'18"E	50-100	2000	20	2.89	2	0.41	0.39	-0.03
Jura		JuraL	42°57'N 05°44'E	<1	1300	10	2.67	0	0.48	0.44	-0.06
Pyrénées orientales	Léca	LecL	42°28'07"N 02°31'40"E	<1	1250	20	2.37	1	0.34	0.30	-0.11
	Prats de Mollo	PraL	42°25'21"N 02°24'38"E	<1	1450	20	2.44	1	0.31	0.32	0.02
	Lapreste	LapL	42°24'34"N 02°22'51"E	<1	1230	15	2.44	0	0.42	0.34	-0.21
	Eyne	EynH	42°28'27"N 02°07'05"E	5-10	1915	20	2.78	0	0.38	0.35	-0.06
	Puigmal	PuiH	42°23'26"N 2°05'0"E	5-10	2045	20	2.74	0	0.39	0.34	-0.10
	Lac des bouillouses	BouH	42°33'31"N 01°59'42"E	50-100	2005	20	2.56	0,0	0.37	0.34	-0.05
Pyrénées centrales	Camurac	CamI	42°46'30"N 01°55'45"E	10-20	1600	20	2.92	0	0.42	0.38	-0.09
	Massat	MasI	42°49'18"N 01°30'75"E	<1	1500	20	2.59	0	0.41	0.40	0.0007
	Soulcem	SouH	42°39'28"N 01°27'27"E	50-100	2035	20	2.63	0	0.41	0.39	-0.01
	Soulcem	SouL	42°41'28"N 01°27'07"E	<1	1240	20	2.74	0	0.37	0.39	0.08
	Étang de lhers	VicH	42°47'36"N 01°24'16"E	20-50	1940	20	2.74	0	0.38	0.35	-0.07
	Étang de lhers	VicL	42°48'23"N 01°22'31"E	1-5	1275	20	2.44	0	0.36	0.32	-0.09
	Espot	SpoI	42°33'47"N 01°05'36"E	<1	1515	20	4.18	0	0.35	0.43	0.10
	Bethmale	BetL	42°51'42"N 01°04'02"E	1-5	1385	20	2.67	0	0.40	0.37	-0.06
	Bethmale	BetH	42°50'24"N 01°03'42"E	50-100	1920	20	2.92	0	0.40	0.37	-0.03
	Val d'Aran	AraH	42°39'45"N 00°58'56"E	<1	2075	20	2.26	0	0.29	0.29	0.05
	Le Mourtis	MouL	42°54'32"N 00°46'31"E	5-10	1440	20	2.59	0	0.33	0.33	0.04
	Peyragudes	GudI	42°47'42"N 00°27'14"E	5-10	1650	20	2.67	0	0.39	0.37	-0.03
	Hourquette d'ancizan	HouL	42°53'57"N 00°18'13"E	5-10	1565	20	2.74	0	0.42	0.40	-0.04
	Néouvielle	NeoH	42°48'N 00°09'E	50-100	2200	20	2.56	0	0.47	0.44	-0.03
	Le Peyras	PeyL	42°59'15"N 00°10'46"E	5-10	1220	20	2.33	0	0.36	0.36	0.03
	Col du Tourmalet	TouH	42°53'57"N 00°07'54"E	5-10	1950	20	2.81	1	0.42	0.39	-0.04
	Cirque de Troumouse	TroH	42°43'41"N 00°05'40"E	5-10	2080	20	2.44	0	0.39	0.38	0.02
	Chiroulet	ChiL	42°57'38"N 00°04'17"E	1-5	1240	20	2.70	0	0.38	0.37	0.02
	Luz-Ardiden	LuzH	42°52'45"N 00°03'34"W	10-20	1905	20	2.63	0	0.37	0.37	0.02
	Huesca	EspI	42°45'08"N 00°14'18"W	>100	1640	20	2.27	0	0.20	0.30	0.32
Lac du Tech	TecL	42°54'40"N 00°15'32"W	<1	1240	20	2.41	0	0.39	0.34	-0.11	
Col du Somport	SomI	42°47'41"N 00°31'38"W	<1	1645	20	2.26	0	0.33	0.37	0.16	
Pyrénées occidentales	Col de la Pierre-Saint-Martin	Piel	42°58'07"N 00°45'52"W	<1	1830	20	2.00	0	0.28	0.29	0.09

Tab. 1. Localisation géographique et diversité génétique de populations de *Rhododendron ferrugineum*. n = nombre d'échantillon, Ar = richesse allélique, H_o = hétérozygotie observée, H_e = hétérozygotie attendue, F_{IS} = coefficient de consanguinité (valeurs non significatives en gras, P<0.01).

trois paires : BetH/BetL et SouH/SouL géographiquement très proches (moins de 3 km) et CamI/EynH éloignées de 35 km l'une de l'autre. La moyenne des valeurs de FST est relativement faible (0,267) et la plupart des valeurs les plus élevées (>0.33) résultent de la comparaison des populations de l'est et de l'ouest de la chaîne des Pyrénées.

Les analyses réalisées à l'aide du logiciel STRUCTURE montrent que le nombre de groupes génétiques le plus probable est K = 2 puis K = 6. Pour K = 2, les populations des Alpes, du Jura et de l'est des Pyrénées sont affiliées à une même lignée génétique tandis que les populations du centre et de l'ouest des Pyrénées sont groupées dans une seconde lignée génétique. La population AlpI comporte une proportion à peu près égale d'individus provenant des deux lignées. Pour K = 6, les populations des Alpes et du Jura sont assignées au

même groupe (CL1) et celles des Pyrénées sont séparées en cinq groupes répartis le long d'un gradient longitudinal (CL2 à CL6).

3. Flux de gènes

Les flux de gènes entre les populations étudiées (Alpes, Jura et Pyrénées) sont faibles (Nm = 0,72 migrants par génération), atteignant 2,88 pour l'ensemble des populations pyrénéennes, 2,10 entre les populations de l'est (CL2) et 5,9 pour la lignée du centre et de l'ouest (CL3 à CL6).

IV. Discussion

L'analyse microsatellite a révélé un niveau de diversité génétique relativement élevé dans les Pyrénées (Ar : 2 – 4,18 ;

HE : 0,29 – 0,44) mais cependant plus faible que dans les Alpes ou les Apennins (Ar : 2,71 – 5,57 ; HE : 0,37 – 0,68 ; BRUNI *et al.* 2012) ou que pour d'autres espèces pyrénéennes (*Pinus uncinata* : HE : 0,83 – 0,99 ; DZIALUK *et al.* 2009 ; *Quercus petraea* : HE : 0,76 – 0,84 ; ALBERTO *et al.* 2010). Bien que la multiplication végétative et l'autofécondation soient des facteurs diminuant la diversité génétique d'une espèce (KOELLING *et al.* 2011), la durée de vie élevée des individus (ESCARAVAGE *et al.* 1998, PORNON *et al.* 2000) et la forte dépression de consanguinité (données personnelles) pourraient permettre un maintien relativement élevé de la diversité génétique chez cette espèce. Le fort déficit en hétérozygotes trouvé dans certaines populations a également été observé dans les Apennins et dans les Alpes (BRUNI *et al.* 2012).

1. L'origine Alpine des lignées génétiques pyrénéennes

Le genre *Rhododendron*, originaire d'Asie (GOETSCH *et al.* 2005), aurait colonisé l'Europe d'est en ouest. Notre hypothèse est que des individus des Alpes auraient ensuite migré dans les Pyrénées induisant une plus faible diversité dans les Pyrénées que dans les Alpes. Dans notre étude, nous avons identifié deux lignées génétiques distinctes : la première trouvée seulement dans la population alpine AlpI et dans les populations du centre et de l'ouest des Pyrénées et la seconde également présente dans la population AlpI mais aussi dans les populations alpines AutH et AlpH, celle du Jura et dans les populations de l'est de la chaîne pyrénéenne. Comparées aux populations alpines, les populations pyrénéennes présentaient une plus faible diversité génétique (Ar, H_E, H_O) suggérant des goulots d'étranglement le long des routes de colonisation (DEMASURE *et al.* 1995, STEHLIK *et al.* 2002). La présence de steppes entre les Alpes et les Pyrénées (BURGA & PERRET 1998) ont pu permettre la migration d'espèces alpines soit par le sud-ouest des Alpes (SCHÖNSWETTER *et al.* 2005 ; KROPFT *et al.* 2006) soit par le nord des Alpes puis par le Massif central qui est considéré comme une route majeure de colonisation vers les Pyrénées (BRAUN-BLANQUET 1948).

2. Patron génétique et histoire phylogéographique de *R. ferrugineum* dans les Pyrénées

Le patron génétique actuel des populations de *R. ferrugineum* semble résulter de la colonisation des Pyrénées par deux lignées génétiques alpines, puis de l'isolement de certaines populations lors des évènements de glaciation. Au sein des Pyrénées, la forte différenciation et les faibles flux de gènes entre les deux lignées génétiques suggèrent qu'il y a eu peu d'introgression entre ces deux lignées. Cela est probablement dû aux barrières topographiques (hauts sommets, grands glaciers), à la dispersion des graines par barochorie et aux faibles distances parcourues par les pollinisateurs limitant les flux de gènes entre les populations et leur homogénéisation génétique. Une séparation entre les lignées de l'est et de l'ouest de la chaîne des Pyrénées est également observée chez d'autres espèces (*Papaver alpinum*, KROPFT *et al.* 2006 ; *Trifolium alpinum*, LAUGA *et al.* 2009).

Les populations de l'est de la chaîne sont peu différenciées les unes des autres malgré une distance relativement

importante entre elles (35 km entre CamI et EynH). Par ailleurs, elles se développent dans des environnements très différents, sont de tailles variables et présentent peu de flux de gènes. Cela suggère que ces populations ont récemment échangé des gènes. Ces échanges de gènes ont pu se faire dans de grands refuges de basse altitude durant les périodes glaciaires du Pléistocène, puis dans de grandes populations génétiquement connectées sur les grands plateaux d'altitude typiques des Pyrénées-Orientales.

Les petites populations isolées (PraL, LecL, LapL) présentent un niveau relativement élevé d'hétérozygotie (H_E, H_O) ainsi que des allèles privés malgré la faible richesse allélique probablement due à la perte d'allèles rares par dérive génétique (LESICA & ALLENDORF 1995). Ces petites populations se développent dans des conditions environnementales inhabituelles *i.e.* dans des vallées profondes et très ombragées, principalement couvertes de hêtres (*Fagus sylvatica* L.) parfois à proximité de forêts de *Quercus ilex* L.. Ces données suggèrent que ces populations sont des populations relictuelles (HAMPE & PETIT 2005) ayant persisté à basse altitude à la faveur de conditions abiotiques micro-stationnelles favorables et isolées depuis la remontée à haute altitude de l'espèce.

Les quatre groupes génétiques de la lignée de l'ouest semblent être une sous structure de la séparation est/ouest des Pyrénées. Une différenciation génétique claire apparaît entre les groupes CL3/CL4 et peu d'introgression est observée entre ces groupes et CL6. Les niveaux relativement élevés d'introgression entre les groupes CL5/CL4 et CL5/CL6 suggèrent des échanges de gènes assez récents. Ces introgressions concernent des populations parfois isolées et très éloignées les unes des autres (AraH et les populations de CL5). Des échanges de gènes pourraient avoir eu lieu dans de grands refuges de basse altitude le long du piémont pyrénéen avant la recolonisation des zones de haute altitude. Ce patron de colonisation a déjà été observé pour *Quercus petraea* (Matt.) Lieb. (ALBERTO *et al.* 2010) et suggéré pour *Aster pyrenaicus* Desf. ex DC. (ESCARAVAGE *et al.* 2011). Par ailleurs, le patron de distribution en groupes génétiquement différents les uns des autres et ayant des niveaux de diversité génétique comparables est compatible avec l'hypothèse de survie d'une espèce dans différents refuges comme cela a été proposé pour d'autres espèces pyrénéennes (LAUGA *et al.* 2009, SEGARRA-MORAGUES *et al.* 2007). Les fortes diversités génétiques observées dans les populations SpoI et TouH (possède un allèle privé) pourraient indiquer la présence de refuges de haute altitude (nunataks) le long de la chaîne pyrénéenne. Le patron phylogéographique dans cette partie des Pyrénées pourrait à la fois résulter d'un isolement et d'une différenciation des populations dans des nunataks mais également d'échanges de gènes dans des refuges de basse altitude.

En conclusion, les Pyrénées sont habituellement vues comme une barrière aux migrations nord/sud des espèces. À l'instar de précédents travaux (LAUGA *et al.* 2009, SEGARRA-MORAGUES *et al.* 2007), notre étude révèle un rôle plus complexe des Pyrénées dans les processus biogéographiques. *Rhododendron ferrugineum* présente deux lignées génétiquement isolées, qui ont probablement colonisé les Pyrénées depuis les Alpes et le Jura. Nos résultats montrent que la lignée de l'est a

probablement survécu aux événements de glaciation dans de grands refuges de basse altitude, laissant de petites populations relictuelles lors de la recolonisation des hautes altitudes, ce qui est en accord avec notre Hyp. 3. Au centre et à l'ouest de la chaîne, la structuration génétique en groupes distincts suggère que l'espèce a survécu dans des nunataks (Hyp. 2) mais également, possiblement, dans des refuges de basse altitude (Hyp. 1). Aucune donnée palynologique n'est disponible pour confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses en raison de la rareté des pollens entomophiles dans les sédiments et de la difficulté de différencier les pollens de *R. ferrugineum* et de *Vaccinium* spp.

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTO, F., J. NIORT, J. DERORY, O. LEPAIS, D. GALOP, A. KREMER. 2010. – Population differentiation of sessile oak at the altitudinal front of migration in the French Pyrenees. *Molecular Ecology*, 19: 2626 - 2639.
- BELKHIR, K., P. BORSA, L. CHIKHI, N. RAUFASTE, F. BONHOMME. 2004. – GENETIX 4.0. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier.
- BRAUN-BLANQUET, J. 1948. – Les souches préglaciaires de la flore pyrénéenne. *Collectana Botanica*, 2: 1-23.
- BRUNI, I., F. DE MATTIA, M. LABRA, F. GRASSI, S. FLUCH, M. BERENYI, C. FERRARI. 2012. – Genetic variability of relict *Rhododendron ferrugineum* L. populations in the Northern Apennines with some inferences for a conservation strategy. *Plant Biosystems*, 146 (1), 24-32.
- BURGA, C.A. & R. PERRET. 1998. – *Vegetation und Klima der Schweiz seit dem jüngeren Eiszeitalter*. Ott, Thun, 832 pp.
- BYARS, S.G., Y. PARSONS, A.A. HOFFMANN. 2009. – Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. *Annals of Botany*, 103: 885-899, doi:10.1093/aob/mcp018.
- CHARRIER, O., C.E.L. DELMAS, A. PORNON, N. ESCARAVAGE. 2013. – Development of 18 microsatellite markers in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) for investigating genetic structure at margins. *Conservation Genetics Resources*, 5: 473-477, doi 10.1007/s12686-012-9831-2.
- DELMAS, C.E.L., E. LHUILLIER, A. PORNON, N. ESCARAVAGE. 2011. – Isolation and characterization of microsatellite loci in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) using pyrosequencing technology. *American Journal of Botany*, e120-e122.
- DELMAS, C.E.L., N. ESCARAVAGE, A. PORNON. 2014. – Massive floral display affects insect visits but not pollinator-mediated pollen transfer in *Rhododendron ferrugineum*. *Plant Biology*, 16 (1):234-43, doi: 10.1111/plb.12039.
- DEMASURE, B., N. SODZI, R.J. PETIT. 1995. – A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4: 129-131.
- DZIALUK, A., E. MUCHEWICZ, A. BORATYNSKI, J.M. MONTSERRAT, K. BORATYNSKA, J. BURCZYK. 2009. – Genetic variation of *Pinus uncinata* (Pinaceae) in the Pyrenees determined with cpSSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 277: 197-205.
- ESCARAVAGE, N., A. PORNON, B. DOCHE, I. TILLBOTTRAUD. 1997. – Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian Journal of Botany*, 75: 736-743.
- ESCARAVAGE, S. QUESTIAU, A. PORNON, B. DOCHE, P. TABERLET. 1998. – Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Molecular Ecology*, 7: 975-982.
- ESCARAVAGE, N. & J. WAGNER. 2004. – Pollination effectiveness and pollen dispersal in a *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) population. *Plant Biology*, 6: 000A ± 000J.
- ESCARAVAGE, N., J. CAMBECÈDES, G. LARGIER, A. PORNON. 2011. – Conservation genetics of the rare Pyreneo-Cantabrian endemic *Aster pyrenaicus* (Asteraceae). *AoB Plants*, plr029 doi: 10.1093/aobpla/plr029.
- FRANKEL, O.H., A.H.D. BROWN, J.J. BURDON. 1995. – *The conservation of plant biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge, XIV-299 pp.
- FREEMAN, S. & J.C. HERRON. 2007. – *Evolutionary analysis*. 4th Edition. Pearson Education, Inc, xiv-834 pp.
- GOETSCH, L., A.J. ECKERT, B.D. HALL. 2005. – The molecular systematics of *Rhododendron* (Ericaceae): a phylogeny based upon RPB2 gene sequences. *American Society of Plant Taxonomists*, 30: 616-626.
- HAHN, T., C.J. KETTLE, J. GHAZOUL, E.R. FREI, P. MATTER, A.R. PLUESS. 2012. – Patterns of genetic variation across altitude in three plant species of semi-dry grasslands. *PLoS ONE*, 7 (8) : e41608, doi:10.1371/journal.pone.0041608.
- HAMPE, A. & R.J. PETIT. 2005. – Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, 8: 461-467.
- HAMRICK, J.L. & M.J.W. GODT. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant source: philosophical transactions. *Biological Sciences*, 351 (1345): 1291-1298.
- HEWITT, G.M. 2000. – The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-913.
- JALUT, G., M.J. MONSERRAT, M. FONTUGNE, G. DELIBRIAS, J.M. VILAPLANA, R. JULIA. 1992. – Glacial to interglacial vegetation changes in the northern and southern Pyrenees: deglaciation, vegetation cover and chronology. *Quaternary Science Reviews*, 11: 449-480.
- JEANNEL, R. 1946. – Le peuplement des Pyrénées. *Revue française d'entomologie*, 14 (1) : 53-104.
- KOELLING, V.A., J.L. HAMRICK, R. MAURICIO. 2011. – Genetic diversity and structure in two species of *Leavenworthia* with self-incompatible and self-compatible populations. *Heredity*, 106 (2): 310-318.
- KÖRNER, C. 1999. – *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems*. Springer, Heidelberg, XI-344 pp.
- KÖRNER, C. 2003. – *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems*. 2nd edition, Springer, Heidelberg, XI-344 pp.
- KROPF, M., H.P. COMES, J.W. KADEREIT. 2006. – Long-distance dispersal vs vicariance: the origin and genetic diversity of alpine plants in the Spanish Sierra Nevada. *New Phytologist*, 172: 169-184.
- LAUGA, B., S. MALAVAL, G. LARGIER, C. REGNAULT-ROGER. 2009. – Two lineages of *Trifolium alpinum* (Fabaceae) in the Pyrenees: evidence from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Acta Botanica Gallica*, 156 (3): 317-330.
- LESICA, P. & F.W. ALLENDORF. – 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology*, 9 (4): 753-760.
- MÉDAIL, F. & K. DIADEMA. 2009. – Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*, 36: 1333-1345.
- MEIRMANS, P.G. & P.H. VAN TIENDEREN. 2004. – GENOTYPE and

- GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*, 4 (4): 792-794.
- PAULS, S.U., C. NOWAK, M. BALINT, M. PFENNINGER. 2013. – The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular Ecology*, 22 (4): 925-946.
- PEAKALL, R. & P.E. SMOUSE. 2006. – GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- PORNON, A., N. ESCARAVAGE, P. THOMAS, P. TABERLET. 2000. – Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) populations. *Molecular Ecology*, 9: 1099-1111.
- PRITCHARD, J.K., M. STEPHENS, P.J. DONNELLY. 2000. – Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- RAYMOND, M. & F. ROUSSET. 1995. – GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- SCHÖNSWETTER, P., I. STEHLIK, R. HOLDEREGGER, A. TRIBSCH. 2005. – Molecular evidence for glacial refugia of mountain plants in the European Alps. *Molecular Ecology*, 14: 3547-3555.
- SEGARRA-MORAGUES, J.G., M. PALOP-ESTEBAN, F. GONZALEZ-CANDELAS, P. CATALAN. 2007. – Nunatak survival vs. tabula rasa in the Central Pyrenees: a study on the endemic plant species *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *Journal of Biogeography*, 34: 1893-1906.
- STEHLIK, I., J.J. SCHNELLER, K. BACHMANN. 2002. – Immigration and *in situ* glacial survival of the low-alpine *Erinus alpinus* (Scrophulariaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 77: 87-103.
- TABERLET, P., L. FUMAGALLI, A.G. WUST-SAUCY, J.F. COSSON. 1998. – Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.
- VAN OOSTERHOUT, C., W.F. HUTCHINSON, D.P.M. WILLS, P. SHIPLEY. 2004. – Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4 (3): 535-538.
- WEIR, B.S., C.C. COCKERHAM. 1984. – Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6): 1358-1370.