

# HYBRIDATION INTROGRESSIVE ENTRE *PINUS SYLVESTRIS* L. ET *PINUS UNCINATA* RAM. EN VALAIS (SUISSE). INTÉRÊT COMPARÉ DE DIFFÉRENTES MÉTHODES D'ANALYSES DE DONNÉES MORPHOANATOMIQUES ET PHYTOCHIMIQUES

INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION BETWEEN *PINUS SYLVESTRIS* L.  
AND *PINUS UNCINATA* RAM. IN THE VALAIS (SWITZERLAND).  
COMPARED INTEREST OF DIFFERENT METHODS FOR ANALYZING  
MORPHOLOGICAL AND PHYTOCHEMICAL CHARACTERS

PLUMETTAZ CLOT A.C.<sup>1</sup>, NEET-SARQUEDA C.<sup>1</sup>, LAURANSON-BROYER J.<sup>2</sup> & LEBRETON P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut de Botanique systématique et de Géobotanique de l'Université de Lausanne, Bâtiment de biologie, CH-1015 Lausanne, Suisse.

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie Végétale, Université de Lyon-I, F-69622 Villeurbanne, France.

**Résumé** Des hybrides naturels entre *Pinus sylvestris* L. et *Pinus uncinata* Ram. in Lam. and DC ont été décrits plusieurs fois en Europe. Nous avons étudié l'introggression de ces espèces en Valais (Suisse) par la morphoanatomie et la phytochimie dans une population où les deux pins étaient en contact. Nous avons utilisé comme témoins deux populations monospécifiques.

Les critères les plus performants pour distinguer les deux espèces pures se sont avérés être :

- pour les aiguilles : leur couleur et leur poids sec ; la forme des cellules annexes du stomate, la forme en coupe transversale des cellules épidermiques, le nombre de canaux résinifères ;
- pour les cônes : l'indice d'asymétrie (rapport entre l'épaisseur de la plus grosse apophyse et celle de l'apophyse opposée) ;
- parmi les flavonoïdes : la teneur relative en quercétine.

Dans la population mixte, nous avons observé une plus grande variabilité des phénotypes et des caractères que dans les populations témoins. Les méthodes d'analyse globale (analyse discriminante, analyse factorielle des correspondances, indices phénotypiques) laissent entrevoir la possibilité d'existence d'hybrides. Mais c'est l'étude des individus caractère par caractère (coefficients de corrélation de Spearman, diagrammes de dispersion, spectres de recombinaison) qui apportent le plus d'arguments pour une introggression entre les deux pins.

Les deux approches, morphoanatomique et phytochimique, sont complémentaires : certains hybrides ne sont décelables que par l'existence d'une contradiction entre les données de l'une et celles de l'autre. Nous proposons un indice ( $I_{pu}$ ), intégrant les meilleurs caractères discriminants, pour mettre en évidence les individus hybrides.

**Mots clés** : *Pinus sylvestris*, *Pinus uncinata*, cônes, aiguilles, stomates, flavonoïdes, hybridation introgressive, recombinaison de caractères.

**Summary** : Natural hybridizations between *Pinus sylvestris* L. and *Pinus uncinata* Ram. in Lam. and DC. are supposed from various places in Europe. We studied introggression between both species, in the Valais (Switzerland), by using morphological and phytochemical data. We compared three sampling sites : two in which each species is isolated and one in which both species are in contact.

We found that the most useful characters to discriminate the species are :

- for needles : the colour and the dry weight, the shape of stomata guard cells, the shape of epidermic cells (in cross section), the number of resin canals.
- for cones : the asymetry index (thickness ratio of the largest apophysis to the opposite one).
- among flavonoids : the quercetin relative content.

In the mixed population, there is a greater variability of characters and phenotypes than in the presumed pure populations. Global statistical analyses (discriminant analysis, correspondence analysis, phenotypic index) let us suppose that hybridization occurs. But the study of characters (Spearman's correlation, dispersion diagram, recombination pattern) gives more arguments for introggression.

Both approaches, using flavonoids markers or morphoanatomical characters, are complementary : some hybrids are only revealed by a contradiction between morphological and phytochemical observations.

We propose an index ( $I_{pu}$ ) based on the best discriminant characters to reveal the hybrids.

**Key words** : *Pinus sylvestris*, *Pinus uncinata*, cones, leaves, stomata, flavonoids, introgressive hybridization, characters recombination.

## 1 - INTRODUCTION

Le Pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) et le Pin de montagne (*Pinus mugo* agr.) sont phylétiquement proches : leur nombre chromosomique est identique ( $2n = 24$ ), leurs caryotypes sont ressemblants (Saylor 1964) et des hybridations ont été obtenues en culture (Liese 1927, Dengler 1942, Schütt und Hattemer 1959). Des croisements naturels ont été suspectés par de nombreux auteurs dans les principaux massifs montagneux d'Europe (pour les Alpes : Christ 1864, Gams 1928/29, Schmid 1936 et 1951, Marcet 1967, Montacchini 1968). Dans les zones de contact entre Pins sylvestres et Pins de montagne, certains caractères atypiques ou intermédiaires ont été observés notamment dans la forme et l'anatomie des aiguilles et des cônes (Flous 1933, 1934 ; Marcet 1967 ; Szweykowski 1969 ; Staszkiwicz and Tyszkiewicz 1969, 1972 ; Musil 1977 ; Szweykowski and Bobowicz 1982), la forme et la taille des grains de pollen (Aytug 1962, Cantegrel 1983, Probst 1983), le temps de germination des graines et le nombre de cotylédons (Probst 1983, Probst et Rouane 1984). Sur la base de données morphoanatomiques, l'hypothèse d'une hybridation naturelle introgressive fut proposée par Marcet (1967), puis par Staszkiwicz and Tyszkiewicz (1969, 1972).

De tels hybrides existent-ils dans les Alpes valaisannes, comme le laissait supposer l'article de Marcet (1967)? Comment mettre en évidence l'introgression supposée? Nous avons échantillonné une population dans laquelle les deux espèces de pins entraient en contact, et nous l'avons comparée avec deux populations témoins monospécifiques.

Nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur les critères taxonomiques classiques, morphoanatomiques et phytochimiques. A partir de ces données, nous avons comparé l'efficacité de plusieurs analyses pour tester l'hypothèse d'introgression. Un article précédent discutait des résultats obtenus par une analyse discriminante (Neet-Sarqueda et al. 1988) : sur la fonction discriminante pré-établie à partir des populations témoins, les individus supposés hybrides sont projetés et ordonnés entre les deux pôles spécifiques. Cette méthode a mis en évidence la présence dans la population mixte d'individus globalement intermédiaires mais sans qu'on puisse affirmer qu'il s'agisse d'hybrides introgressifs. Dans ce papier nous discuterons les apports respectifs d'analyses des individus (indices phénotypiques, analyse factorielle en composantes principales) et d'analyses des caractères (corrélations de caractères, spectre de recombinaison).

Dans un deuxième temps, dans le but de se rapprocher du génôme, des études enzymologiques sur le même matériel font l'objet d'une thèse en préparation (Neet-Sarqueda, à paraître).

## 2 - MATÉRIEL

### 2.1 Taxons en présence.

De nombreuses races géographiques de Pin sylvestre ont été proposées par les systématiciens. La

morphoanatomie des pins valaisans les rattache selon De Ferré (1979) aux populations européennes méridionales, leur composition chimique les situe parmi les pins d'altitude (Laracine-Pittet et Lebreton 1988, Lebreton et al. 1990).

La taxonomie des Pins de montagne a été discutée par Sandoz (1987) et par Christensen (1987). Ce complexe se présente comme un *continuum* de formes entre deux pôles (espèces pour Sandoz, sous-espèces pour Christensen) : le Pin rampant oriental (*Pinus mugo* Turra) et le Pin à crochets occidental (*Pinus uncinata* Ram. in Lam. et DC.). Les pins de montagne que nous avons échantillonnés correspondent à la description du Pin à crochets occidental.

### 2.2 Choix des sites.

En Valais, les principales essences forestières se succèdent comme suit : Chêne pubescent (et Pin sylvestre) à l'étage collinéen, Pin sylvestre à l'étage montagnard, Épicéa ou Sapin à l'étage subalpin inférieur, Arole et Mélèze à l'étage subalpin supérieur (Theurillat 1991). C'est à ce dernier étage qu'appartiennent la plupart des peuplements de Pin à crochets. Cet arbre ne descend dans les étages inférieurs et n'entre en contact avec le Pin sylvestre que dans des conditions édaphiques défavorables à l'Épicéa et au Sapin : éboulements, dalles rocheuses, couloirs à avalanche, affleurements de gypse, etc. (Braun-Blanquet et Richard 1949, Richard 1984).

Un tel contact se produit sur le flanc d'une montagne calcaire escarpée, sillonnée de couloirs à avalanche : le versant est du Catogne, au lieu-dit le Devin, dans les Dranses valaisannes. A l'étage montagnard, le climat intra-alpin à tendance continentale ( $P = 730$  mm/an) est favorable au développement de pinèdes du type *Ononido-Pinetum* (Plumettaz Clot 1988). Deux stations différentes ont été échantillonnées :

- coeur de l'étage montagnard. Les Pins à crochets y sont en contact avec les Pins sylvestres qui occupent les flancs plus abrités du versant (individus 1 à 9) ;
- la deuxième station est sise à 1500 m (coordonnées 575.80/97.60), sur des dalles affleurantes de calcaire dur où les derniers Pins sylvestres côtoient les Pins à crochets (individus 10 à 25).

Les deux populations suivantes ont été choisies comme témoins :

- une population correspondant au taxon classique de *Pinus sylvestris* : à Chamoson dans le Valais central, (coordonnées 583.96/117.61, altitude 800 m, sur moraine calcaire surmontant du calcaire jurassique). La sécheresse estivale de cet adret montagnard exposé à un climat continental marqué ( $P = 570$  mm/an) exclut la présence du Pin à crochets. L'association est un *Odontito-Pinetum* (Plumettaz Clot 1988) ;
- une population représentative des *Pinus uncinata* ; dans les Préalpes, vers Solalex (coordonnées 577.20/126.73, altitude 1525 m, sur éboulis de calcaire crétacique). A la limite supérieure de la forêt, au bas d'une pente balayée régulièrement par les avalanches et en climat subatlantique montagnard ( $P=1600$  mm/an), cette station d'*Erico-Pinetum uncinatae* (Plumettaz Clot 1988) ne peut convenir au Pin sylvestre.

TABLEAU I - Caractères morphoanatomiques et phytochimiques étudiés ; méthodes de prélèvement, de préparation et de mesures.

<b>Aiguilles</b>	
P	Poids moyen (en g) de 10 paires d'aiguilles sèches saines prélevées au hasard au centre des rameaux. Les pousses de l'année ont été systématiquement éliminées. Les rameaux proviennent si possible du côté ombragé de l'arbre.
L	Longueur moyenne (en cm) de 10 aiguilles.
h	Hauteur moyenne (en mm) des aiguilles mesurée sur 15 coupes (Fig.1A). Les coupes transversales de 10 microns sont faites au microtome à partir d'un tronçon de 5 mm prélevé au centre de l'aiguille et inclus dans de la résine BMAD19 après vidage des cellules par l'eau de Javel (méthode décrite en détail dans Plumettaz Clot 1988). Les moyennes sont calculées sur 15 coupes soit 5 aiguilles par arbre et 3 coupes par aiguille.
d	Distance moyenne (en mm) entre les faisceaux libéro-ligneux mesurée sur 15 coupes (Fig.1A)
l	Largeur moyenne (en mm) des aiguilles mesurée sur 15 coupes (Fig.1A).
c	Nombre moyen de canaux résinifères calculé sur 15 coupes (Fig.1A).
IS	Indice de section des aiguilles selon Marcet 1967 (moyenne calculée sur 15 coupes, fig.1A) : largeur de l'aiguille (l) x distance entre les faisceaux libéro-ligneux (d) / hauteur de l'aiguille (h)(en mm).
C	Forme en coupe transversale des cellules épidermiques (Fig.1B) : carrée (variable codée 1) ou rectangulaire (codée 2). Caractère tout ou rien.
lce	Forme en coupe transversale de la lumière des cellules épidermiques (Fig.1B) : punctiforme (codée 1) ou allongée (codée 2). Caractère tout ou rien.
G	Forme des cellules de garde des stomates observées au microscope sur un "scalp" d'épiderme d'aiguille (Fig.2) : en bourrelet bien délimité (codée 1) ou à bords diffus (codée 2). Caractère tout ou rien.
<b>Cônes</b>	
Lc	Longueur moyenne (en cm) de cinq cônes (Fig.1C).
lc	Plus grande largeur moyenne (en cm) mesurée sur 5 cônes (Fig.1C).
Ic	Forme du cône: rapport de la largeur à la longueur du cône (moyenne sur cinq cônes).
La	Longueur moyenne (en mm) de l'écusson de l'apophyse la plus épaisse (mesurée sur 5 cônes) (Fig.1D).
la	Largeur moyenne (en mm) de l'écusson de l'apophyse la plus épaisse (mesurée sur 5 cônes) (Fig.1D).
la	Forme de l'apophyse la plus épaisse : rapport de la longueur et de la largeur de l'écusson de l'apophyse la plus épaisse (moyenne sur 5 cônes) (Fig.1D).
ea	Épaisseur moyenne (en mm) de l'apophyse la plus épaisse (mesurée sur 5 cônes) (Fig.1D).
cao	Épaisseur moyenne (en mm) de l'apophyse opposée à l'apophyse la plus épaisse (Fig.1C et D).
IA	Indice d'asymétrie du cône (moyenne calculée pour 5 cônes) : rapport des épaisseurs de l'apophyse la plus épaisse et de son opposée dans le cône (Fig.1C et D).
<b>Habitus</b>	
CA	Couleur relative (par rapport aux populations témoins) des aiguilles fraîches sur les rameaux de l'année précédente et codée comme suit: vert clair ou vert gris (codée 1), vert foncé ou vert bleu (codée 2).
ci	Forme de la cime : évasée en parasol (codée 1), pointue (codée 2).
Ht	Hauteur de l'arbre (en m).
Pt	Port du tronc : tronc dressé, droit (codée 1), tronc légèrement courbé à la base (codée 2), tronc très courbé à la base (codée 3), tronc couché seules les branches se redressant (codée 4).
Dt	Diamètre du tronc (en m).
CE	Couleur de l'écorce observée in situ dans le haut du tronc et codée comme suit : orangée (codée 1), panachée de gris et d'orange (codée 2), grise (codée 3).
ME	Morphologie de l'écorce à la hauteur 1,50m : grandes écailles (environ >5cm de longueur) (codée 1), petites écailles (environ <5cm de longueur) (codée 2).
<b>Flavonoïdes</b>	
Q%	Teneur relative en quercétine: pourcentage de la quercétine par rapport à l'ensemble des aglycones flavoniques dosés (en %).
Q	Teneur absolue en quercétine ( $10^{-2}$ mg x g <sup>-1</sup> ) : quantité de pigment dosé par gramme de matière sèche.
AF	Teneur absolue en aglycones flavoniques (mg x g <sup>-1</sup> )
PA	Teneur absolue en proanthocyanes (mg x g <sup>-1</sup> ).
PD	Teneur absolue en prodelfinidine ( $10^{-2}$ mg x g <sup>-1</sup> ).
I%	Teneur relative en isorhamnétine (en %).
PC	Teneur absolue en procyanidine ( $10^{-2}$ mg x g <sup>-1</sup> ).
I	Teneur absolue en isorhamnétine ( $10^{-2}$ mg x g <sup>-1</sup> ).
K	Teneur absolue en kaempférol ( $10^{-2}$ mg x g <sup>-1</sup> ).
K%	Teneur relative en kaempférol (en %).
K/I	Rapport des teneurs absolues en kaempférol et en isorhamnétine.
PD/PC	Rapport des teneurs absolues en prodelfinidine et en procyanidine.

### 3 - MÉTHODE

#### 3.1 Saisie et codification des caractères.

Dans chaque population nous avons prélevé des échantillons sur 25 arbres choisis au hasard (cf. Neet-Sarqueda *et al.* 1988). Chaque individu est représenté par 38 variables (Tableau I) décrivant l'habitus de l'arbre, la couleur, les dimensions et l'anatomie des aiguilles (Fig.1A, 1B et 2), la forme et la taille des cônes (Fig.1C, 1D), la composition flavonique des aiguilles.

##### 3.1.1 Caractères morphoanatomiques originaux.

Si la plupart des caractères morphologiques étudiés sont ceux de la littérature, nous avons utilisé quelques critères morphoanatomiques originaux :

- l'aspect extérieur des stomates vus de dessus : les cellules annexes forment un anneau en bourrelet protubérant chez le Pin sylvestre, tandis que chez le Pin à crochets, elles ne sont que légèrement saillantes et difficiles à délimiter de l'épiderme environnant (Fig.2). Nous avons d'abord défini ce critère à l'aide du microscope à balayage, sur plusieurs échantillons provenant d'individus différents. Les observations de routine ont pu être faites à la loupe binoculaire ou au microscope sur des simples scalps d'aiguilles. Ce caractère est stable puisque dans toutes nos observations nous n'avons pas trouvé d'intermédiaires entre ces deux formes.
- l'indice d'asymétrie du cône, que nous proposons comme le rapport de l'épaisseur de l'apophyse la plus épaisse du cône à celle de l'apophyse opposée (Fig.1C et D). Il permet de caractériser les cônes en évitant la dispersion des mesures simples due à la variabilité individuelle.

##### 3.1.2 Caractères phytochimiques.

Le dosage des teneurs en flavonoïdes a porté sur cinq pigments : trois aglycones flavoniques (quercétine, isorhamnétine et kaempférol) et deux proanthocyanes (prodelphinidine et procyanidine). Le détail de ces analyses se trouve dans le Tableau II (voir aussi Lauranson 1989). Les résultats ont été exprimés en teneurs absolues (quantité de pigment dosée par gramme de matière sèche), teneurs relatives (pourcentage du total des aglycones flavoniques ou des pro-anthocyanes) et rapport des teneurs absolues entre deux pigments de la même famille.

#### 3.2 Traitement des données.

Pour trier les caractères discriminant les espèces pures, nous avons d'abord effectué une analyse de variance (Tableau III).

Puis, plusieurs techniques de taxonomie numérique aux principes différents ont été mises en oeuvre pour tester l'hypothèse d'hybridation introgressive entre le Pin sylvestre et le Pin à crochets :

- Indices phénotypiques d'hybridation (Anderson 1949) : cumul des tendances spécifiques exprimées par chaque caractère après interpolation entre des bornes postulées (Tableau IV et Fig.3).
- Analyse factorielle en composantes principales : visualisation des degrés de ressemblance globale, statistique et sans *a priori* (Fig.4).
- Corrélation de caractères : comparaison des caractères 2 à 2, sans *a priori* (Fig.5).

- Spectres de recombinaison : comparaison du comportement des caractères dans l'individu et la population, après interpolation entre des bornes postulées (Fig.6).

### 4 - RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

#### 4.1 Argumentation.

En dehors de critères génétiques, Anderson (1949) et Kissling (1980) ont proposés une suite d'arguments taxonomiques favorables à la thèse d'hybridation introgressive :

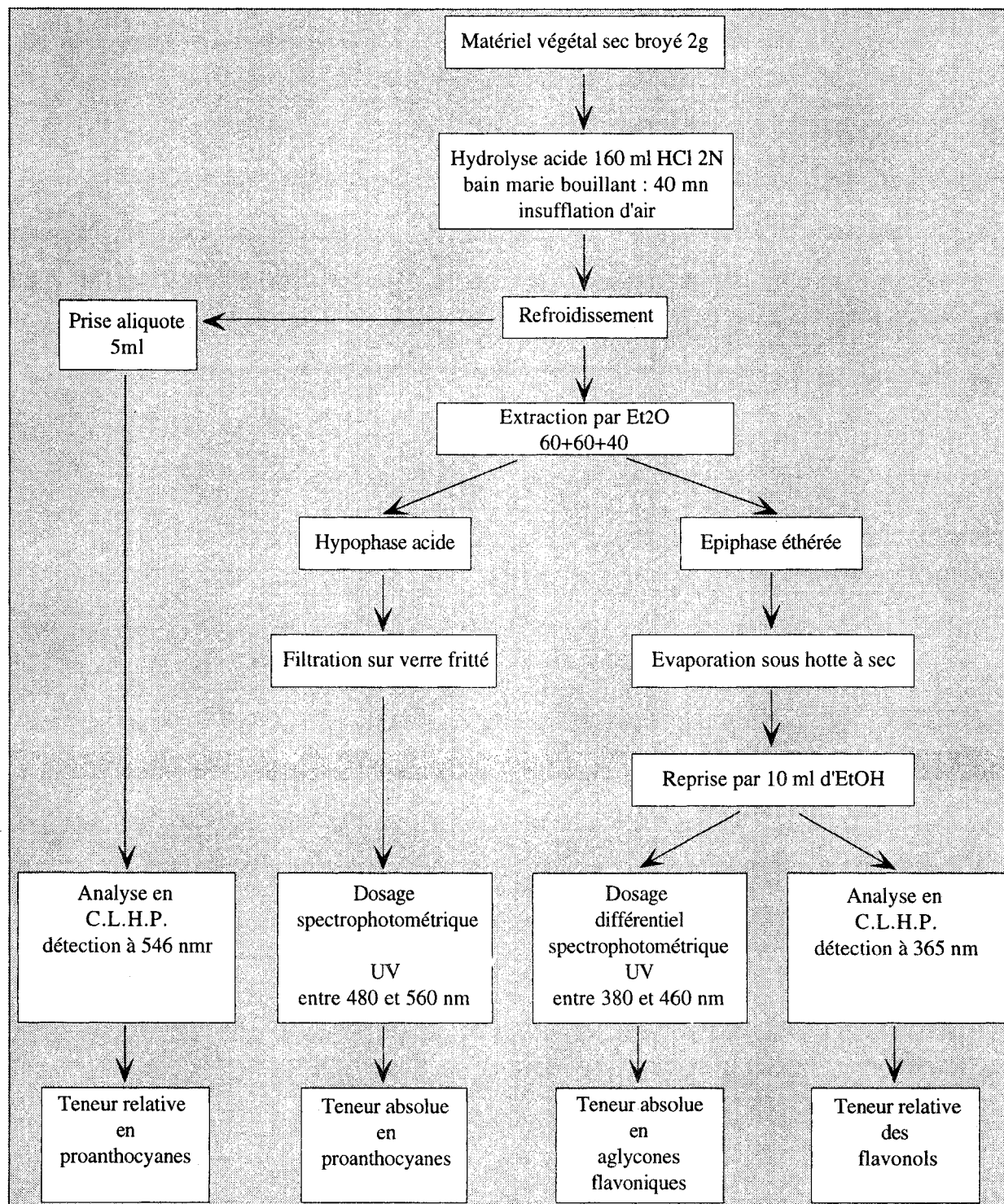
- a la gradation des réalisations des caractères entre les domaines de deux taxons classiques, due à la redistribution aléatoire des chromosomes dans la méiose.
- b l'existence d'individus globalement intermédiaires (découlant de a).
- c la corrélation entre les caractères discriminants dans une population mixte sans hiatus, due au linkage et à la répartition aléatoire des chromosomes lors de la méiose (ce qui donne sa forme au fuseau de recombinaison).  
Chez un individu globalement immergé dans le domaine de variation classique d'un taxon A :
- d la déviation conjointe de 2 ou 3 caractères quantitatifs en direction d'un autre taxon B. C'est le résultat de la présence par croisements en retour de fragments chromosomiques du taxon B avec linkage de 2 ou 3 caractères (introgression).
- e un caractère unique qualitatif propre au taxon B (dont l'invention à répétition est improbable).

#### 4.2 Analyse de variance simple

Les caractères morphoanatomiques qui discriminent le mieux les populations pures de Chamoson et de Solalex sont (Tableau III) : la forme de la cime, la couleur et la morphologie de l'écorce, la couleur et le poids des aiguilles, le nombre de canaux résinifères ainsi que la forme des cellules épidermiques des aiguilles. A côté de ces critères déjà utilisés par d'autres auteurs, nos caractères originaux se révèlent aussi performants : les cellules annexes des stomates sont toujours mieux délimitées chez le Pin sylvestre que chez le Pin à crochets (Fig.2) ; l'indice d'asymétrie du cône est utile pour distinguer le Pin à crochets, à cônes fortement asymétriques, du Pin sylvestre, à cônes presque symétriques. Notons aussi que l'indice de section (IS) préconisé par Marcet (1967) s'avère dans notre cas peu fiable car les écarts-types sont importants. Seules les valeurs extrêmes sont intéressantes.

Parmi les pigments des aiguilles, plusieurs marqueurs chimiques s'avèrent efficaces. Les aiguilles du Pin à crochets sont de manière générale plus riches en proanthocyanes et plus pauvres en aglycones flavoniques que celles du Pin sylvestre. La teneur relative en quercétine est le paramètre chimique le plus fiable pour distinguer les deux espèces. Elle passe, en moyenne, de 12% du total des aglycones flavoniques dans les aiguilles de Pin à crochets à près de 40% chez le Pin sylvestre (Lauranson 1989, Lauranson et Lebreton 1991).

TABLEAU II. Protocole des analyses phytochimiques (selon Lauranson 1989)



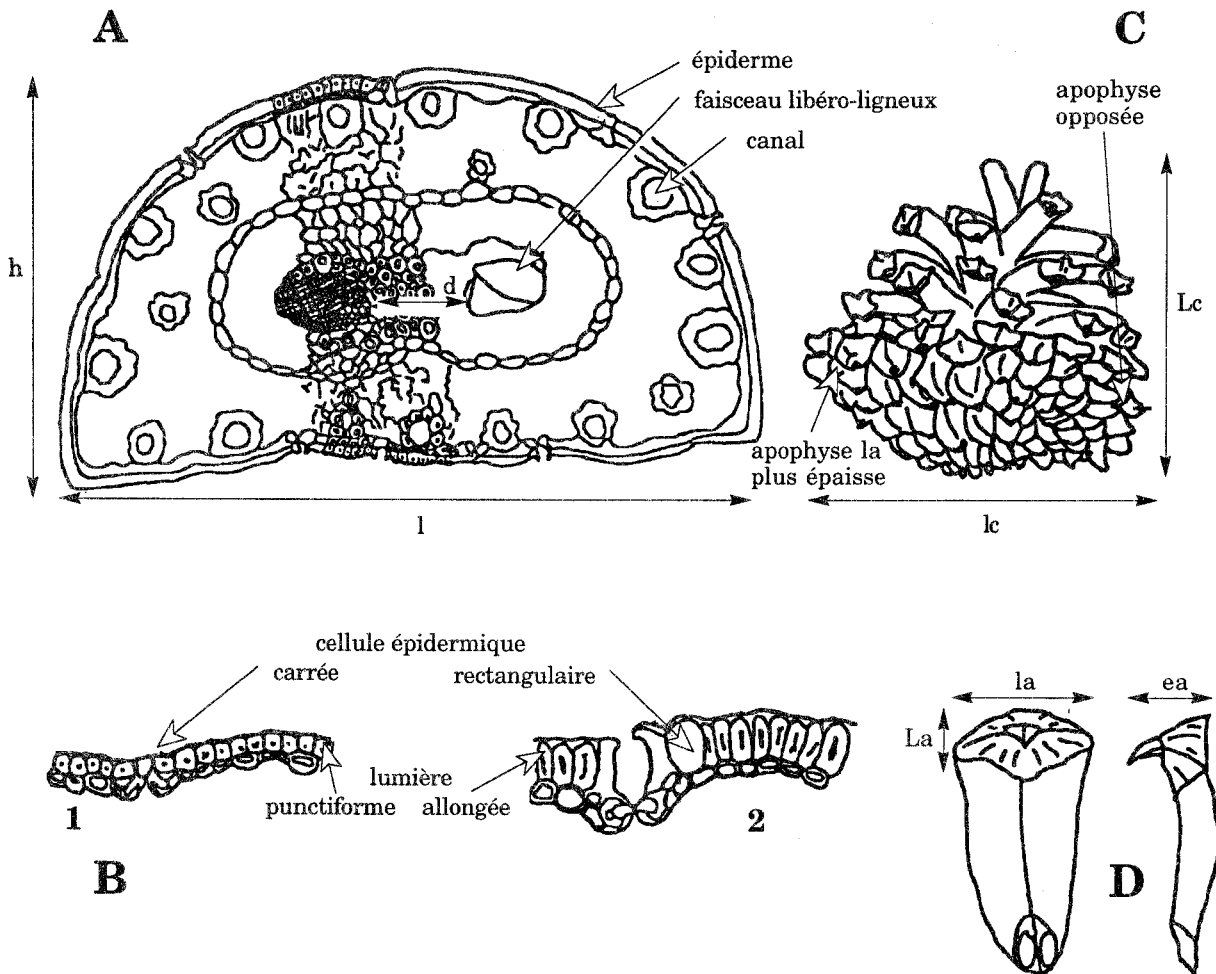


Fig.1. Détails anatomiques et caractères mesurés.— A: coupe d'aiguille. — B: cellules épidermiques: 1. *Pinus sylvestris*; 2. *Pinus uncinata*. — C: cône. — D: écaille de cône.

#### 4.3 Indices phénotypiques d'Anderson.

Pour visualiser la variabilité de la population mixte, des indices phénotypiques, adaptés d'Anderson (1936) et de Mandin (1984), sont calculés pour chaque individu, à partir des caractères morphologiques et phyto-chimiques les plus discriminants. Nous avons choisi d'exprimer cet indice comme la moyenne par individu de valeurs codées pour chaque caractère (Tableau IV). Ces règles de codification ne concernent que nos deux populations de référence et ne sauraient pour l'instant être généralisées aux espèces.

La fréquence des indices phénotypiques montrent une gradation des phénotypes de la population mixte entre les pôles que constituent les populations pures (Fig.3). Cette méthode confirme qu'il y a des individus intermédiaires (argument b, cf. 4.1), elle ne permet cependant pas d'affirmer que les intermédiaires sont des hybrides introgressifs. Elle peut surtout servir à la classification ultérieure de formes intermédiaires.

#### 4.4 Analyse factorielle en composantes principales.

Si les analyses précédentes (discriminante, indices phénotypiques d'hybridation) sont fondées sur une classification de référence *a priori*, l'analyse factorielle en composantes principales présente une démarche plus

objective puisque les taxons de référence sont cernés après coup sur la projection graphique.

En comparant deux analyses basées sur les données morphologiques pour l'une (Fig.4A) et phytochimiques pour l'autre (Fig.4B), on peut déduire que :

- les populations témoins sont nettement séparées, ce qu'on est en droit d'attendre de deux taxons distincts et justifie notre *a priori* utilisé comme base dans d'autres méthodes.
- les individus de la population mixte couvrent un champ de variation large, chevauchant celui des populations témoins, et forment un essaim homogène.

Ces analyses en composantes principales suggèrent que la population du Devin ne se présente pas comme la somme de deux sous-populations biométriquement disjointes, mais comme un essaim d'individus rendus tous différents par les aléas des recombinaisons génétiques.

Cependant comme pour les autres méthodes globales, un seul argument (b, cf.4.1) est fourni pour confirmer l'hypothèse d'hybridation introgressive :

- il y a dans la population mixte des individus qui globalement sont intermédiaires par rapport aux individus des populations de référence.

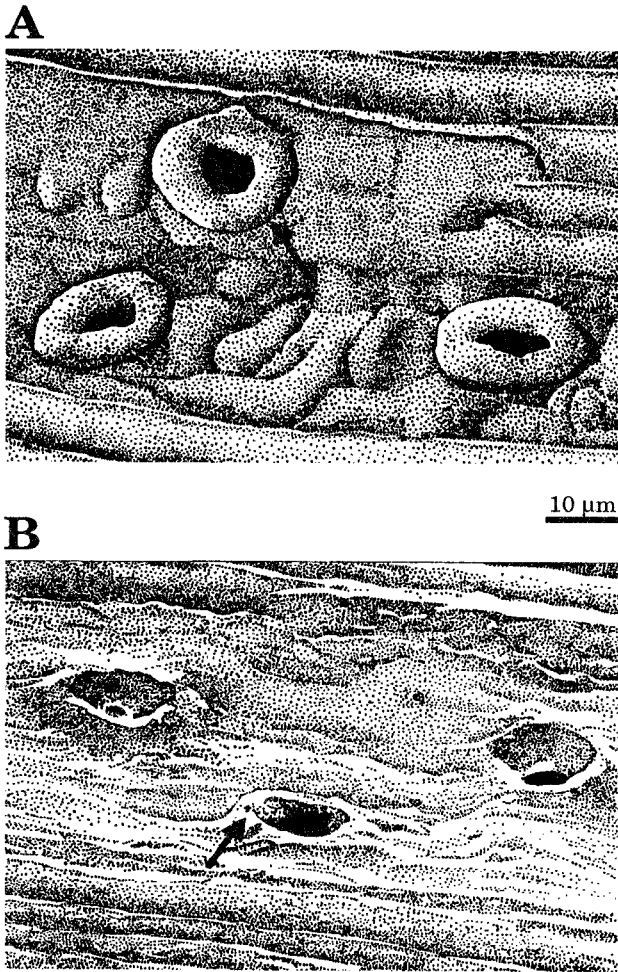


Fig. 2. Vue polaires comparées des cellules annexes des stomates (dessins d'après photographie au microscope à balayage). - A : en bourrelet chez *Pinus sylvestris*. - B : en continuité avec l'épiderme chez *Pinus uncinata*.

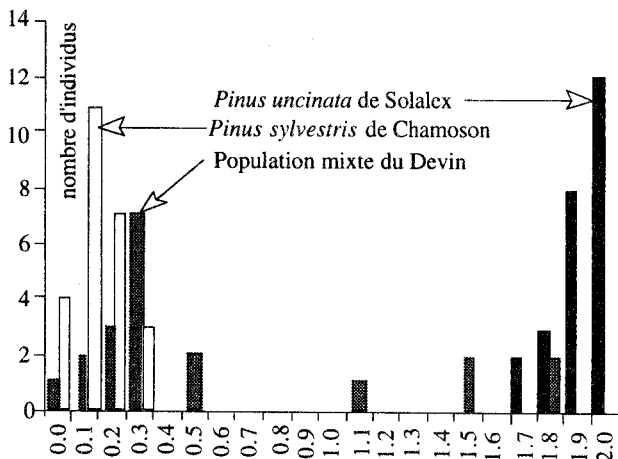


Fig. 3. Fréquence des indices phénotypiques (adaptés de Anderson 1936, Mandin 1984) dans les trois populations

Ces méthodes ne peuvent par contre nous apprendre :

- si les individus intermédiaires ont des caractères intermédiaires ou une combinaison de caractères extrêmes.

- si dans la population mixte les caractères sont corrélés ou indépendants.
- si les populations de référence sont uniquement composées de taxons purs ou s'il y a aussi des individus introgressés.

Pour aller plus avant il apparaît nécessaire d'étudier le comportement des caractères. C'est l'objectif des deux méthodes suivantes.

#### 4.5 Corrélation de caractères et diagrammes de dispersion.

Le coefficient de Spearman utilisable pour les distributions non normales est appliqué à quelques caractères continus et discriminants pour la population du Devin. Plusieurs caractères sans relations anatomiques ou physiologiques évidentes sont effectivement corrélés (Tableau V).

Dans la figure 5, la corrélation du taux de quercétine avec le nombre de canaux résinifères est visualisée par un diagramme de dispersion. Le nuage de points des échantillons du Devin est compact, en pente, sans recombinaisons extrêmes (conditions nécessaires du fuseau de recombinaison, argument c, cf. 4.1).

#### 4.6 Spectres de recombinaison.

La Figure 6B détaille les tendances exprimées par chaque caractère chez les individus du Devin, comparées avec les profils des populations témoins (Fig.6A et 6C). Les arbres sont classés selon un indice de ressemblance ( $I_{pu}$ ) avec les Pins à crochets, calculé selon les valeurs codées du Tableau II.

On observe au Devin trois catégories de profils :

- quelques-uns très proches des témoins *sylvestris* ou *uncinata*.
- une majorité qui tend clairement vers un des pôles mais avec quelques caractères aux valeurs intermédiaires ou se rapprochant de celles du pôle opposé.
- quelques cas avec un  $I_{pu}$  intermédiaire et plusieurs caractères recombinaisonnés.

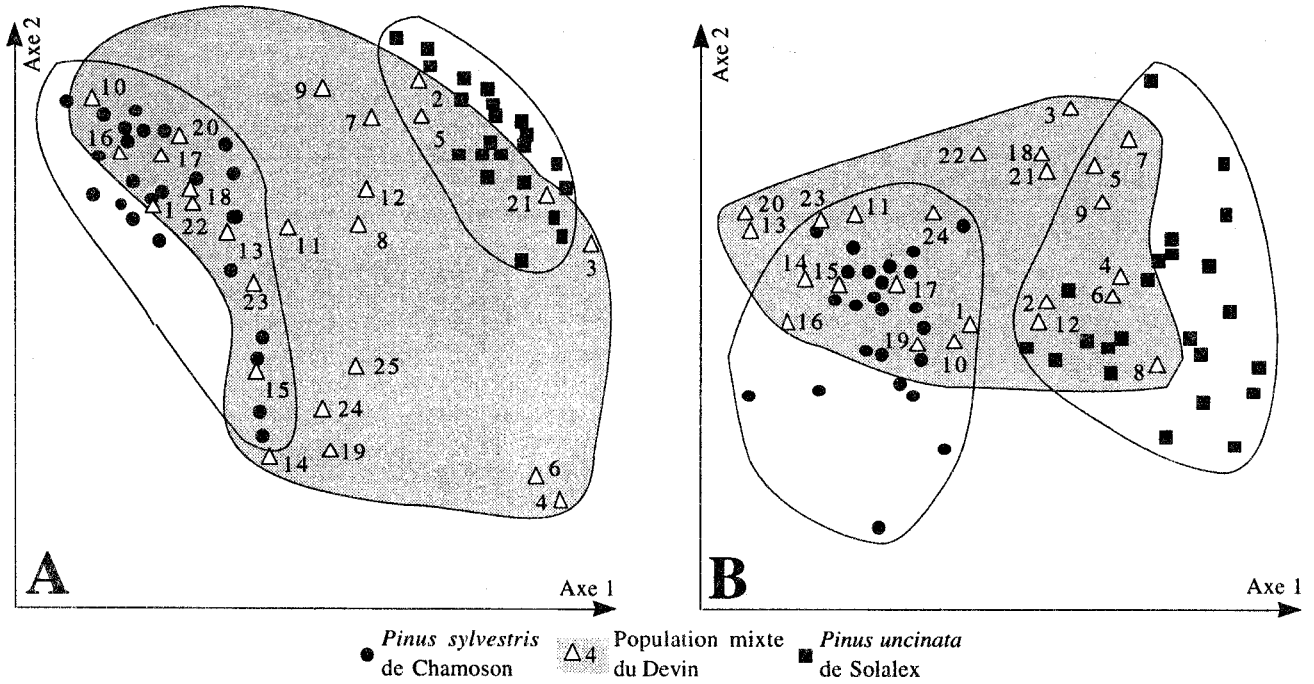
Les spectres de distribution des caractères amènent un argument supplémentaire : l'argument d (cf. 4.1).

Plusieurs individus sont globalement peu distincts d'un des taxons de référence mais il y apparaît conjointement quelques déviations vers l'autre taxon de caractères non redondants et quantitatifs (hauteur des aiguilles, nombre de canaux, indice d'asymétrie ou taux en quercétine, par exemple). L'individu 11 apporte même l'argument e : avec un spectre général de type Pin sylvestre, les aiguilles présentent des cellules épidermiques de forme Pin à crochets.

## 5 - CONCLUSIONS

### 5.1 Influence sur les résultats du choix des caractères.

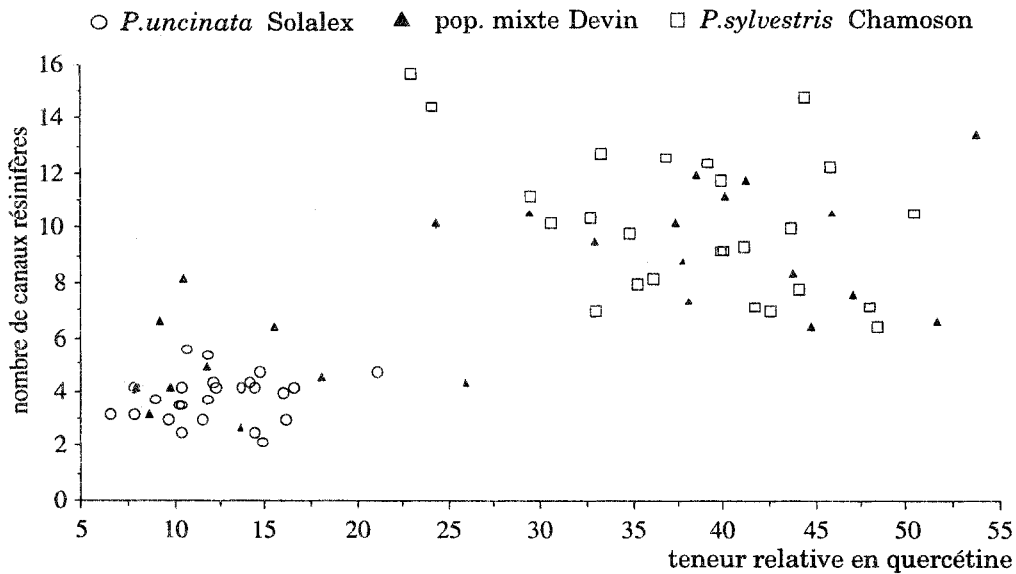
La comparaison des Figures 6A, 6B et 6C permet d'affirmer que si tous les critères morphologiques retenus apportent de l'information, les caractères les plus intéressants comme marqueurs de l'hybridation sont : le nombre de canaux résinifères et l'indice d'asymétrie du cône.



**Fig. 4.** Analyses en composantes principales des trois populations. - A: caractères morphologiques. - B: caractères phytochimiques

Contribution des caractères à la définition des axes (en %)

Analyse Axes	morphoanatomique		phytochimique	
	1	2	1	2
Caractères				
IS	13.1	6.7	PA	18.5
ME	13.1	7.2	PD	18.2
L	12.3	2.4	Q	18.0
CE	12.0	0.4	AF	15.7
CA	11.1	2.8	K	4.6
d	10.6	9.1	PC	13.0
C	10.6	11.5	K/I	8.6
c	10.3	13.9	PD/PC	0.0
h	3.7	22.6	I	3.4
l	2.8	23.0		
Variations extraites	46%	19%	61%	22%



**Fig. 5.** Diagramme de dispersion des caractères: comparaison du taux relatif de quercétine et du nombre de canaux résinifères.

Ces deux caractères sont significativement corrélés (0,001) dans la population du Devin.



**TABLEAU III.** Moyennes, écarts-types et pouvoir discriminant (PD) des caractères étudiés dans les deux populations témoins (mesures et unités voir Tableau I).

Caractères	Moyennes et écarts-types		PD
	population <i>P. uncinata</i> de Solalex	population <i>P. sylvestris</i> de Chamason	
<b>Aiguilles</b>			
P	37.3 ± 7.4	12.9 ± 4.3	**
G	2.0 ± 0	1.0 ± 0	**
C	2.0 ± 0	1.0 ± 0	**
lce	2.0 ± 0	1.0 ± 0	**
L	4.5 ± 0.7	3.0 ± 0.7	*
h	8.3 ± 0.8	6.3 ± 0.9	*
c	3.8 ± 1.1	10.2 ± 3.0	*
IS	2.5 ± 0.8	4.1 ± 1.4	-
d	1.3 ± 0.4	1.9 ± 0.5	-
l	15.4 ± 1.7	13.6 ± 1.7	-
<b>Cônes</b>			
IA	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.0	**
ea	4.3 ± 0.6	2.5 ± 0.5	*
La	8.7 ± 0.6	7.0 ± 0.7	*
la	1.2 ± 0.0	1.0 ± 0.0	*
lc	3.8 ± 0.3	2.6 ± 0.3	-
eao	2.5 ± 0.2	1.8 ± 0.3	-
Lc	4.0 ± 0.3	3.3 ± 0.4	-
lc	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.0	-
<b>Habitus</b>			
CE	3.0 ± 0	1.0 ± 0	**
ME	3.0 ± 0	1.0 ± 0	**
CA	2.0 ± 0	1.0 ± 0	**
ci	2.0 ± 0	1.0 ± 0	**
Ht	6.6 ± 0.4	7.5 ± 2.5	-
Pt	1.0 ± 0	1.0 ± 0	-
Dt	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	-
<b>Flavonoïdes</b>			
Q%	12.3 ± 3.5	38.3 ± 7.2	**
Q	13.3 ± 4.7	61.2 ± 14.5	**
AG	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1	*
PA	7.1 ± 0.8	4.5 ± 0.6	*
PD	6.5 ± 0.8	4.1 ± 0.6	*
I%	31.9 ± 4.6	18.1 ± 2.5	*
PC	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	-
I	35.6 ± 7.9	28.2 ± 3.8	-
K	59.2 ± 8.0	69.5 ± 11.7	-
K%	43.5 ± 8.5	43.7 ± 6.0	-
K/I	1.8 ± 0.4	2.5 ± 0.5	-
PD/PC	11.4 ± 2.2	11.0 ± 2.2	-

PD= \*\* si  $|x_1 - x_2| > 2 (S_1 + S_2)$   
avec : 1=*P. uncinata*, 2=*P. sylvestris*  
\*si  $|x_1 - x_2| > (S_1 + S_2)$   
avec : x=moyenne sur 25 indiv.  
- si  $|x_1 - x_2| \leq (S_1 + S_2)$   
avec : s=écart-type sur 25 indiv.

**TABLEAU IV.** Caractères retenus pour le calcul des indices phénotypiques (Fig.3) et de l'indice de ressemblance avec *Pinus uncinata* (Fig.6) et valeurs-seuils permettant de coder, pour chaque caractère, la tendance spécifique exprimée.

Caractères	Tendance spécifique		
	<i>P. sylvestris</i>	intermédiaire	<i>P. uncinata</i>
G	1	-	2
C	1	-	2
L	< 3.7	3.7 - 3.8	> 3.8
h	< 7.2	7.2 - 7.5	> 7.5
c	> 7.2	4.9 - 7.2	< 4.9
IS	> 3.3	2.6 - 3.3	< 2.6
IA	< 1.4	1.4 - 1.6	> 1.6
eao	< 3.0	3.0 - 3.7	> 3.7
CE	1	2	3
ME	1	2	3
CA	1	-	2
Q%	> 31.1	15.8 - 31.1	< 15.8
Valeurs codées	0	1	2

**TABLEAU V.** Coefficients de corrélation (Spearman) de quelques caractères discriminants *a priori* non dépendants.

L	-			
ea	-	***(+)		
C	***(+)	-	**(-)	
Q	-	***(-)	***(-)	***(+)
	IS	L	ea	C

\*\*\* corrélation significative à 0,001  
\*\* corrélation significative à 0,005  
(+) corrélation positive  
(-) corrélation négative

L'analyse phytochimique fournit - elle aussi un marqueur intéressant : le taux relatif en quercétine. Le n°7, par exemple, a un taux de quercétine d'environ 25%, valeur intermédiaire qui permet de supposer un génôme hybride.

Les approches morphologiques et phytochimiques affinent l'analyse si elles sont utilisées conjointement. Ainsi, l'hypothèse d'hybridation posée pour le n°7 par la phytochimie est confirmée par la morphologie : l'individu tend vers le Pin à crochets mais avec plusieurs critères atypiques (aiguilles courtes de couleur claire, apophyses des cônes peu épaisses). La comparaison des deux approches permet en outre de déceler des individus intermédiaires caractérisés par des tendances phytochimiques et morphoanatomiques contradictoires. Les n°12 et n°18 sont les cas les plus frappants, avec des stomates et des cellules épidermiques de type Pin sylvestre et des taux de quercétine bas, comme chez le Pin à crochets. La silhouette et l'habitus du n°12 rappellent un Pin à crochets, ceux du n°18 un Pin sylvestre.

Plus on englobe de caractères discriminants différents, plus on a de chance de détecter une hybridation.

### 5.2 Méthodologie : apports respectifs des analyses détaillées des caractères et des méthodes multivariées.

Les techniques intégrant les différentes variables et traitant les individus globalement (discriminante, indices phénotypiques, analyses en composantes principales) sont inappropriées pour discuter la thèse d'hybridation introgressive entre deux espèces. Elles permettent seulement de montrer l'hétérogénéité d'une population. Les techniques privilégiant l'examen détaillé du comportement des caractères (corrélations de caractères, diagrammes de dispersion et spectres de recombinaison) apportent des arguments plus décisifs.

### 5.3 Y a-t-il hybridation des deux espèces en Valais?

Les diverses méthodes d'analyses des données du Devin ont permis de montrer que la population mixte répondait aux cinq arguments taxonomiques (a à e, cf. 4.1) proposés par Anderson (1949) et Kissling (1980).

Pour plusieurs individus du Devin, le diagnostic spécifique est incertain en raison des tendances divergentes de trois caractères ou plus. Quatorze individus se démarquent par leur  $I_{pu}$  supérieur à 3 (maximum observé à Chamoson) et inférieur à 21 (minimum observé à Solalex). Ces individus présentent des phénotypes divergeant notablement des groupes témoins et différant beaucoup entre eux. Ce sont vraisemblablement des hybrides introgressés. Les onze autres individus de la population du Devin ne sont pas pour autant assimilables à des représentants purs des deux taxons. Ils pourraient être introgressés, mais, par le jeu des croisements en retour, présentent un profil trop proche de celui des populations de référence pour en être distingués.

L'existence d'hybridation introgressive entre les deux pins dans cette population est donc hautement probable. Cependant, seules des analyses génétiques apporteraient une preuve définitive.

#### Remerciements :

Les auteurs tiennent à exprimer leur reconnaissance à François Clot, Raymond Delarze, Nicole Galland et Pascal Kissling pour leurs précieux conseils lors de la rédaction de cet article. Nos remerciements vont aussi à André Lüthi pour sa diligence et sa patience lors de la préparation du matériel en laboratoire, ainsi qu'à Karine Burri pour les dessins de la Figure 2.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, E. 1936. Recombination in species crosses. *Genetics*, 24, 668-698.
- ANDERSON, E. 1949. *Introgressive hybridization*. Hafner, New-York, 109 p.
- AYTUG, B. 1962. Diagnose des pollens de *Pinus sylvestris* et *Pinus uncinata* des Pyrénées. *Pollen et Spores*, 4, 283-296.
- BRAUN-BLANQUET, J. & RICHARD, R. 1949. Groupements végétaux et sols du bassin de Sierre. *Bull. Murithienne*, 66, 106-134.
- CANTEGREL, R. 1983. Le Pin à crochets pyrénéen: biologie, biochimie, sylviculture. *Acta Biologica Montana*, 2-3, 87-331.
- CHRIST, H. 1864. Beitrage zur Kenntniss europäischer *Pinus* Arten. *Flora*, 10, 147-159.
- CHRISTENSEN, K.I. 1987. Taxonomic revision of the *Pinus mugo* complex and *P.x rhaetica* (*P.mugo x sylvestris*) (Pinaceae). *Nord. J. Bot.*, 7, 383-407.
- DE FERRE, Y. 1979. Apport de l'étude des plantules dans la connaissance du Pin sylvestre. *Bull. Soc. Bot. France*, 126, 217-226.
- DENGLER, A. 1942. Herkunfts- und Kreuzungsversuche im Versuchsgarten des Waldbauinstituts Eberswalde. *Mitt. Deutsch. Dendrolog. Gesell.*, 55, 157-169.
- FLOUS, F. 1933. Les Pins montagnards et subalpins des Pyrénées. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, LXV, 299-308.
- FLOUS, F. 1934. La question des Pins sylvestres aux Pyrénées. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, LXVI, 181-192.
- GAMS, H. 1928-29. Remarques ultérieures sur l'histoire des pineraies du Valais comparées à celles de l'Europe orientale. *Bull. Murithienne*, 46, 76-96.
- KISSLING, P. 1980. Un réseau de corrélations entre les Chênes (*Quercus*) du Jura. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, 90 (1/2), 1-28.
- LARACINE-PITTET, C. & LEBRETON, P. 1988. Flavonoid variability within *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry*, 27, 2663-2666.
- LAURANSON, J. 1989. *Exploration de la diversité biochimique chez les conifères : contribution à l'étude de l'hybridation Pinus uncinata Ram. x Pinus sylvestris L., et à la connaissance du complexe spécifique Pinus nigra Arn.* Thèse, Université Lyon I, 270 p.
- LAURANSON, J. & LEBRETON, P. 1991. Flavonoid variability within and between natural populations of *Pinus uncinata*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19, (8), 659-664.
- LEBRETON, P., LARACINE-PITTET, C., BAYET, C. & LAURANSON, J. 1990. Variabilité polyphénolique et systématique du Pin sylvestre *Pinus sylvestris* L. *Ann. Sci. For.*, 47, 117-130.
- LIESE, J. 1927. Zur Frage der Bastardbildung zwischen *Pinus sylvestris* und *montana*. *Forstarchiv.*, 3, 202-205.
- MANDIN, J.P. 1984. Note sur la distribution des chênes caducifoliés dans le sud du Vivarais (Ardèche). *Bull. Soc. Linnéenne Lyon*, 10, 326-349.
- MAR CET, E. 1967. Über Nachweis spontaner Hybriden von *Pinus mugo* Turra und *Pinus sylvestris* L. aufgrund von Nadelmerkmalen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, 77, 314-361.
- MONTACCHINI, F. 1968. Il *Pinus mugo* Turra ed il *Pinus uncinata* Miller in Piemonte. La vegetazione. *Allionia*, 24, 123.
- MUSIL, I. 1977. Variability of needles characters in the *Pinus mugo* complex and in *Pinus sylvestris*. *Preslia*, 49, 23-32.
- NEET-SARQUEDA, C., PLUMETTAZ CLOT, A.C. & BECHOLEY, I. 1988. Mise en évidence de l'hybridation introgressive entre *Pinus sylvestris* L. et *Pinus uncinata* DC. en Valais (Suisse) par deux méthodes multivariées. *Botanica Helvetica*, 98, 161-169.

- PLUMETTAZ CLOT, A.C. 1988. *Phyto-écologie des pinèdes valaisannes et contribution à la taxonomie du genre Pinus*. Thèse, Université de Lausanne, 369 p.
- PROBST, A. 1983. *Variation intraspécifique et introgression entre Pinus uncinata Ram. et Pinus sylvestris L. en forêt d'Osséja (Pyrénées Orientales)*. Thèse, Université Paul Sabatier, Toulouse, 221 p.
- PROBST, A. & ROUANE, P. 1984. Introgression entre *Pinus sylvestris* L. et *Pinus uncinata* Ramond dans la forêt d'Osséja (Pyrénées Orientales). In : *Ecologie des milieux montagnards et de haute altitude. Doc. Ecol. Pyrén.*, 3-4, 523-529.
- RICHARD, J.L. 1984. Quelques associations végétales xérophiles du Val de Binn (Haut-Valais, Suisse). *Botanica Helvetica*, 94, 161-176.
- SANDOZ, H. 1987. *Recherches taxonomiques, phyto-écologiques sur les principaux conifères subalpins des Alpes*. Thèse d'Etat, Université Aix-Marseille III, 650 p.
- SAYLOR, L.C. 1964. Karyotype Analysis of *Pinus*-Group *Lariciones*. *Silvae Genetica*, 35 (1).
- SCHMID, E. 1936. Die Reliktföhrenwälder der Alpen. *Beitr. Geobot. Landesaufnahm. Schweiz*, 21, 190 p.
- SCHMID, E. 1951. Die aufrechten Bergföhren in der Schweiz. *Schweiz. Beiträge z. Dendrologie*, 3, 9-13.
- SCHÜTT, P. & HATTEMER, H.H. 1959. Die Eignung von Merkmalen des Nadelquerschnittes für die Kiefern-Bastarddiagnose. *Silvae Genetica*, 8, 93-99.
- STASZKIEWICZ, J. & TYSZKIEWICZ, M. 1969. Les hybrides naturels de *Pinus mugo* Turra et *Pinus sylvestris* L. dans la vallée de Nowy Targ. *Fragm. Florist. Geobot.*, 15, 187-212.
- STASZKIEWICZ, J. & TYSZKIEWICZ, M. 1972. Variability of the natural hybrids of *Pinus sylvestris* L. x *P. mugo* Turra (= *P. rotundata* Link) in south-western Poland and in some selected localities of Bohemia and Moravia. *Fragm. Florist. Geobot*, 18, 173-191.
- SZWEYKOWSKI, J. 1969. The variability of *Pinus mugo* Turra in Poland. *Bull. Soc. Amis Sci. Lettres Poznan*, série D, 10:, 37-54.
- SZWEYKOWSKI, J. & BOBOWICZ M.A. 1982. Variation in *Pinus sylvestris*, *Pinus mugo* and putative hybrid populations in Central Europe : 1. The position of 1-year old conelets. *Bull. Soc. Amis Sci. Lettres Poznan*, série D, 22, 43-50.
- THEURILLAT, J.P. 1991. Les étages de végétation dans les Alpes centrales occidentales. *Saussurea*, 22, 103-147.