

Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière: l'exemple des frênes (Fraxinus excelsior L. et F. angustifolia Vahl)

Pierre Gerard

▶ **To cite this version:**

Pierre Gerard. Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière: l'exemple des frênes (Fraxinus excelsior L. et F. angustifolia Vahl). Life Sciences [q-bio]. ENGREF (AgroParisTech), 2006. English. NNT : . pastel-00001763

HAL Id: pastel-00001763
https://pastel.hal.science/pastel-00001763

Submitted on 15 Sep 2006

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.

ECOLE NATIONALE DU GENIE RURAL, DES EAUX ET DES FORÊTS

N° attribué par la bibliothèque
/__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'ENGREF
Spécialité :
Sciences Forestières

présentée et soutenue publiquement par
Pierre GERARD

*le **22 mars 2006***

*à **l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts***
*Centre de : **Paris***

TITRE :

Isolement reproducteur et dispersion en zone hybride forestière: l'exemple des frênes (*Fraxinus excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl)

devant le jury suivant :

Dr. Antoine KREMER	Examinateur
Pr. Daniel J. HOWARD	Rapporteur
Pr. Alex WIDMER	Rapporteur
Dr. Nicolas BIERNE	Examinateur
Dr. Nathalie FRASCARIA-LACOSTE	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je ne vais pas non plus faillir à la tradition ancestrale des remerciements de thèse. Il me faut donc d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse, Nathalie, qui a bien voulu me faire confiance lorsque je l'ai sollicité du fin fond de la Lorraine pour venir m'initier au monde sans pitié des frênes. Merci pour la liberté que tu m'as laissée, même dans les moments où ma tête trop dure s'évertuait à s'empêtrer dans des manips qui apparemment ne mèneraient à pas grand-chose. Merci pour ta confiance sans faille, et merci d'avoir su trouver à plusieurs reprises les mots pour remonter mon moral qui n'était pas toujours au beau fixe.

Je ne pourrai certainement jamais exprimer suffisamment ma reconnaissance pour ce que je dois à Juanito, el Colombiano, sans qui cette thèse n'aurait certainement pas la même tournure. Merci pour tout ce que tu m'as appris, merci pour les longues discussions scientifiques et autres (on pourrait p't'être ouvrir un magasin de photos un jour…), merci pour ta chaleur humaine, ta bonne humeur et ton optimisme quasiment indestructibles. C'était, j'en suis persuadé, une excellente idée de recruter un thésard et un post-doc (ce post-doc !) sur la même thématique. Gracias para todo, yo te debo mas que tu puedes suponer.

Pour continuer avec les "encadrants" et collaborateurs, je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance envers Fred, Etienne et Christian, les uns m'ayant permis de participer de mon humble pierre à la cathédrale de la dispersion et des mating models, et l'autre m'ayant fait découvrir les joies de la culture in vitro et de la physiologie végétale. Merci à vous pour votre confiance, pour votre patience (oui, Fred, je vais m'y mettre au modèle….), et pour votre gentillesse.

Ensuite viennent les personnes qui m'ont apporté une aide occasionnelle mais à chaque fois cruciale : d'abord Jacqui, dont toutes les interventions au cours de ma thèse m'ont été des plus précieuses. Je sais que tu t'en fous, mais je tiens à te remiercier du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté, bien plus que tu ne dois l'imaginer. Merci également pour ton soutien bref mais incroyablement efficace et ta présence dans les moments de doute les plus intenses. Merci pour les petites discussions scientifiques qui en cinq minutes enrichissent bien plus que d'autres qui peuvent durer une journée. Merci pour les corrections d'articles, merci même pour ta « dureté » à certains moments, qui pousse constamment à se remettre en cause…
Merci aussi à Tatiana pour sa gentillesse et son aide précieuse, en particulier au moment où mon article de dea subsistait dans un état létargique inquiétant, et pour les corrections de l'intro de thèse au dernier moment.
Merci également à Jean, pour qui la forêt n'a plus de secret, et qui m'a fait partager ses innombrables connaissances tout au long de nos pérégrinations, parfois mouvementées (je t'avais dit de laisser tes affaires à l'hôtel…). Merci pour ta grande gentillesse et ta confiance.
Puis il y a aussi Louis, sans qui je n'aurais pas fait long feu sur le terrain. Merci pour le temps passé à faire des allers-retours en Val de Loire, merci pour ton efficacité et ta disponibilité.

Je dois beaucoup également, pour avoir illuminé ma vie au labo au cours de ces bientôt quatre ans, à ma « directrice des ressources humaines » (mais si elle est belle ta robe Pao !). Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, merci pour ton soutien sans faille, Pao.

Bon, ensuite il s'agit de remercier les personnes dont j'ai été le plus proche au cours de ma thèse : je pense que je n'ai pas besoin de m'étendre sur la sincérité de ma reconnaissance et de mon amitié envers Céline, cette âme curieuse, avec qui j'ai partagé la majorité de mes phases d'intense asociabilité. Merci d'avoir toujours été là, merci d'être encore là, merci pour tout. Merci aussi à Benjamin pour sa gentillesse, sa bonne humeur, son soutien (mais si, je t'estime et je t'aime, sincèrement). Merci à Anne, qui même d'Angleterre a été une des personnes à me prodiguer le plus de soutien et de pensées pendant la rédaction. Pour certains, l'arrivée tardive à la fin de ma thèse n'a pas empêché qu'ils fassent partie des personnes qui m'ont été les plus chères : merci, Sylvain, pour tout ce que tu as apporté dans ce bureau au cours de la dernière ligne droite de ma thèse, en si peu de temps. Merci aussi à mes fidèles compagnons de bureau des premières heures : Solenn, merci pour ta gentillesse et ton expertise incroyable en bidouille informatique, pour les

discussions sur les systèmes de reproduction et les coups de gueule auto-entretenus, puisse le sourire de ton petit Noam t'apporter les moments de bonheur que tu mérites ; Michaël GBB, pour le grain de folie que tu as apporté dans ce bureau pendant un long moment ; Djé, le roi de la débrouille, pour la pêche que tu nous as régulièrement transmise, merci pour les nombreux services rendus, merci pour ta gentillesse.

Merci aux thésards anciens, avec qui j'ai partagé peu de moments au labo mais qui sont restés présents par la suite : Marie, pour ton record du monde de gentillesse et ton soutien tout au long de cette épopée « frénétique » (d'accord, v'là l'jeu de mots pourri…) ; Emmanuelle P, merci pour ta gentillesse apaisante et les corrections d'article tardives ; Manuela, Roxana, Clémentine V, merci pour votre bonne humeur et votre chaleureuse présence.
Merci aux thésards contemporains et fraîchement arrivés, toujours pour leur gentillesse et pour ne jamais s'être formalisé de mon personnalité d'ours des cavernes : Mickaël L, Sandrine, Sarah, Aurélie, Julie, Lucie, Damien, Marie-Stan, Noye.

Et merci à tous les autres au labo, qui ont su rester également conviviaux malgré mes faibles capacités pour les relations sociales : Jane, Claire, Thierry, Françoise, Virginie, Lionel, Jean-Michel (merci pour les parties de tennis), Puri, David, Clementine A, Valère, Odile, Odylle, Emmanuelle G…je dois certainement en oublier et j'en suis désolé.

Je tiens à remercier également ma seule et unique stagiaire, d'une efficacité redoutable (parfois un peu trop…), ça a été un plaisir d'encadrer quelqu'un comme toi, Alexandra.

Merci aux membres de mon comité de thèse que je n'ai pas encore cités, Pierre, François et Sylvain. Merci à Claude Millier pour son soutien.

Je voudrais ici, encore une fois, dire tout ce que je dois à Pascal, sans qui cette thèse n'aurait jamais existé. Merci encore pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de continuer en recherche malgré mon grand âge, merci de m'avoir fait sortir d'une période pas très agréable en me permettant de venir travailler avec toi en ces lointaines et froides contrées. Merci d'avoir finalement fait en sorte de finaliser notre travail. Merci encore pour ta gentillesse et ton soutien.

Merci aussi aux membres de mon jury, pour avoir accepté de juger cette thèse et pour leurs encouragements. Merci à Dan pour son incroyable gentillesse, merci d'avoir fait tous ces kilomètres. Merci à Alex et Antoine pour leur gentillesse et leurs encouragements. Merci à Nicolas, grâce à toi ma soutenance a eu une jolie touche d'originalité et j'en suis très fier.

Merci aux amis qui sont restés des amis malgré les trop nombreux échecs sur mon répondeur : Charlie et Cécile, Seb (merci d'être venus), Galou, Kris et Marina, Tof et Ninie, Jérôme et la famille Raoul, Bel'Ange, Rémi, Fanny et Rémy, Chloé et Sylvain, Gus, Manu et Christelle, Cyrille et Régine, Kemar, Delphine et Julien, Virginie, Cécile et Cyrille, Mimi et Tony, Patrick, Solange et Julien, Mo et Davidou, Vincent…..
Merci à Marc et Chantal pour la chaleur des nombreuses soirées que nous avons passé et passeront encore à l'autre bout de Paris, merci pour votre soutien et votre gentillesse.

Enfin, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance, encore une fois, à ceux qui m'ont toujours soutenu, qui ont été présents plus que de raison, qui m'ont gardé toute leur confiance et leur amour pendant les périodes difficiles de mon cursus chaotique. Je suis heureux d'avoir pu offrir cette modeste thèse à mes Gé(niteurs) après ces longues années de stress. Merci aussi à ma petite sœur et ma grand-mère pour avoir toujours été présentes, pour être là, pour être ce qu'elles sont. Merci Mémé pour ton soutien sans faille.

Enfin, cette thèse doit autant à moi qu'à celle qui partage ma vie au jour le jour, qui me supporte, qui m'épaule et sait trouver toujours les mots parfaits au moment où il faut, qui rend ma vie tellement plus belle tous les jours. Merci pour ce que tu m'apportes, j'aime tant les moments que nous partageons ensemble, j'aime tant la vie avec toi.

Cette thèse est également dédiée à mes grand-pères et ma grand-mère.

POLLEN

Blessure d'âme appel
de la plante en péril
Les corolles s'empourprent
au passage des dieux

EDMOND JABES, LE SEUIL *Le Milieu d'ombre*, 1955

Les forêts ont leurs feuillures secrètes
leurs nids de miel de hiboux du bal
et leurs anneaux de chiffon d'émail de lumière
pour habiller les fées

EDMOND JABES, JE BATIS MA DEMEURE *La voix d'encre*, 1949

Le *dedans* et le *dehors* ne sont que la part arbitraire
de la division d'un infini-temps dont la minute
promue remet constamment en cause le centre.

Toute minute est point culminant du néant.

« Quatre sont les phares de l'orgueil, disais-tu,
et quatre seront ceux de la chute »

EDMOND JABES, LE LIVRE DES QUESTIONS ·*(El, ou le dernier livre)*, 1973

PROLOGUE

Cette thèse présente une synthèse des travaux que j'ai menés sur les processus d'hybridation entre deux espèces de frêne en populations naturelles.

Une brève introduction présente le contexte au sein duquel mes travaux s'insèrent : d'abord je présente quelques idées récentes publiées sur le concept d'espèce et ses implications dans l'étude de l'hybridation entre taxons flous, suivies d'une revue bibliographique synthétique concernant les zones hybrides et leur évolution. Après une présentation de quelques exemples de zones hybrides forestières, j'introduis le modèle d'étude sur lequel j'ai travaillé. La question de la reconnaissance des deux espèces est présentée dans le premier chapitre, puis l'influence des variations climatiques sur l'isolement des espèces et la structure des zones hybrides dans le chapitre suivant. Les chapitres 3 et 4 portent principalement sur l'étude de l'isolement temporel, des régimes de reproduction et de la dispersion dans une population de zone hybride. Les chapitres 1 à 3 sont présentés sous forme d'articles en cours de publication ou de préparation, et le chapitre 4 est une ébauche de ce qui pourra faire l'objet de la préparation d'un autre article.

Enfin, la conclusion discute l'implication de l'ensemble des résultats dans la dynamique et l'évolution des zones hybrides de frênes, puis les met en perspective par rapport à des projets de recherche à venir ou envisageables.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 5

I. SUR LE CONCEPT D'ESPECE. 7

II. ZONES HYBRIDES ET SPECIATION 13
1. Origine et biogéographie des zones hybrides 13
2. Isolement reproducteur 15
2.1. Isolement zygotique et post-zygotique 15
2.2. Isolement pré-zygotique 16
Isolement intrinsèque 16
Isolement écologique 17
3. Dynamique et évolution des zones hybrides 20
3.1. Fusion des espèces 20
Disparition de la zone hybride 20
Spéciation hybride 21
Invasion, extinction 22
3.2. Stabilité des zones hybrides 23
3.3. Mouvement des zones hybrides 25
3.4. Divergence des espèces 26
3.5. Renforcement 26

III. HYBRIDATION CHEZ LES ARBRES FORESTIERS 28

IV. LES FRENES EUROPEENS 29

CHAPITRE PREMIER
RECONNAISSANCE D'ESPECES 45

CHAPITRE 2
ZONES HYBRIDES ET VARIATIONS CLIMATIQUES 63

CHAPITRE 3
PHENOLOGIE FLORALE ET FLUX DE GENES 99

CHAPITRE 4
DYNAMIQUE D'UNE POPULATION DE ZONE HYBRIDE 161

CONCLUSION - PERSPECTIVES 171

INTRODUCTION

Les zones d'hybridation occupent depuis longtemps une place particulière en biologie de l'évolution. Selon Richard Harrison, deux principales raisons ont suscité cet intérêt : d'abord ces zones offrent un « regard » privilégié sur les processus évolutifs menant à la formation de nouvelles espèces, et d'autre part elles mettent à mal les schémas traditionnels de classification des taxonomistes (Harrison 1990). Précédant toute étude en zone hybride viennent des questions telles que : qu'est-ce qu'implique le terme « zone hybride » ? Qu'entend-on par hybridation ? Quelles entités interagissent au sein d'une zone hybride ? Tout l'embarras que peut provoquer ce genre d'interrogations peut être effectivement résumé par ces quelques phrases d'Ernst Mayr :

« It is very difficult to define this term [hybridization], or at least to delimit it against various forms of intraspecific interbreeding. The use of the term hybridization is undoubtedly justified if individuals of different families, genera or good species interbreed. But to what extent can the interbreeding of individuals of different subspecies or merely distinct populations of the same species be called hybridization? » (Mayr 1942, p. 258-59).

Par ailleurs, ne peut-on considérer que tous les êtres vivants issus d'événements de reproduction sexuée (donc nous) sont des hybrides ? Dans un sens très large, on entend par hybride le produit du croisement de deux parents distinguables par un ou plusieurs traits héréditaires (Harrison 1990; Fischer 1999), et qui sont souvent considérés comme appartenant à des lignées divergentes. Ceci amène finalement à s'intéresser à un problème récurrent en biologie depuis plus d'un siècle, le problème de la définition de l'espèce.

I. SUR LE CONCEPT D'ESPECE.

Le concept d'espèce est l'une des sources les plus anciennes et les plus persistantes de débats en biologie, dont l'apogée fut atteinte dans la deuxième moitié du XXe siècle. A cet égard, de nombreux naturalistes et évolutionnistes semblent avoir une attitude assez ambivalente : ils ont tendance à accueillir avec une certaine réticence toute discussion sur le concept d'espèce, mais ne peuvent pas résister à la tentation de lire tout ce qui peut être publié sur le sujet et de finalement participer au débat (Pigliucci 2003b). Il ne s'agit pas ici de retracer l'histoire des idées sur le sujet, ni de faire une analyse critique de la multitude des concepts existants (pour une liste complète voir [Mayden 1997] ; pour une revue de leur principaux défauts, voir par exemple [Lherminier & Solignac 2005]), mais plutôt de donner un bref aperçu de quelques récentes réflexions sur ce thème.

Deux types de concepts ont vu le jour progressivement, les uns très liés à la taxonomie traditionnelle linnéenne, tel que le Concept Morphologique (MSC, Cronquist 1978) ou le Concept Phénétique (PhSC, Sneath 1976), les autres faisant référence à des processus évolutifs et tentant de s'intégrer à la théorie moderne de l'évolution. Parmi eux, ceux qui connurent le plus grand nombre d'adhérents sont le Concept Biologique (BSC, Dobzhansky 1937; Mayr 1942), basé sur l'isolement reproducteur, le Concept de Cohésion (CSC, Templeton 1989), basé sur l'inclusion et l'échangeabilité démographique, et le Concept Phylogénétique (PSC, *diagnosable version*, Cracraft 1983), basé sur la divergence diagnosticable de lignées. A l'heure actuelle, une des solutions au problème de l'espèce proposée par les défenseurs de ces concepts consiste à élargir ces derniers en démontrant qu'ils ne sont pas incompatibles avec la plupart des autres concepts (pour le BSC, voir par exemple [Mayr 2001; Orr 2001; Coyne & Orr 2004] ; pour le PSC, voir par exemple [de Queiroz 2005a, 2005b] ; pour une discussion sur les deux, et sur la distinction *pattern/process*, voir [Harrison 1998]).

Récemment, Jody Hey a proposé une interprétation des causes profondes du problème de l'espèce, faisant intervenir des propriétés cognitives du cerveau humain (Hey 2001a). Deux mécanismes sont évoqués pour décrire le processus de catégorisation : l'un serait basé sur des règles intrinsèques de reconnaissance (une entité appartient à une catégorie si elle satisfait tous les critères définissant celle-ci), et l'autre, plus probable, serait basé sur un « effet prototype » (à chaque catégorie correspond une image mentale représentative de celle-ci). La mise en place des processus de reconnaissance pourrait être une adaptation à l'existence de motifs récurrents dans la nature. Ainsi, l'attribution d'un prototype « moyen » à une catégorie et sa symbolisation sous forme de mots par l'intermédiaire du langage seraient des conséquences directes de cette récurrence. Les causes du problème de l'espèce apparaissent donc liées à la difficulté de faire correspondre nos images mentales aux formes incroyablement variées de la nature. Et cette difficulté, paradoxalement, est grandissante à mesure que nos connaissances des processus donnant naissance aux groupes évolutifs s'accroissent (Hey 2001b, 2001a). Les conséquences de la dimension subjective de la notion d'espèce ont fait longtemps l'objet de discussions. L'approche nominaliste fut l'une des réponses les plus radicales à ce sujet, partant du principe que toute catégorie est une construction humaine et que seules les entités individuelles ont une existence réelle et sont appréhendables dans le temps et dans l'espace (Burma 1949; Gregg 1950; Ghiselin 1974). Cependant cette approche ne connut pas un grand succès auprès des biologistes.

Si les discussions ont eu lieu principalement au sein de la communauté scientifique, le problème de l'espèce relève autant, si ce n'est plus, de la philosophie des sciences (Hull 2002), ce qui est perçu par certains auteurs comme étant justement à l'origine du problème (Hey 2001b). Car la philosophie est justement « l'art de former, d'inventer, de fabriquer des concepts », lesquels concepts ne peuvent pas être simples : ils ont des composantes et se définissent par elles, ils sont affaire d'articulation, de découpage et de recoupement (Deleuze & Guattari 1991). De fait, une autre issue possible au problème de l'espèce peut être une approche pluraliste de la question. D'une part un pluralisme de *définitions*, où un concept particulier et un seul est applicable à un groupe d'organisme donné (par exemple *Drosophila melanogaster* et *D. simulans* sont des espèces biologiques et rien d'autre), ce qui semble peu réaliste. Ou alors un pluralisme *conceptuel*, où différents concepts peuvent être appliqués au même groupe d'organisme, selon la question posée et l'axe de recherche (pour revue voir Reydon 2005). C'est d'ailleurs cette orientation que semblent prôner certains biologistes en définissant de nouveaux concepts incluant quasiment tous les autres, comme le Concept Général de Lignées Métapopulationnelles (GSC, de Queiroz 2005b). Le GSC postule donc que la seule propriété nécessaire pour définir des espèces est qu'elles soient des lignées de métapopulations évoluant séparément, et que toute autre propriété (isolement reproducteur, spécialisation d'habitat…) est contingente. Un autre type de pluralisme consiste à considérer les espèces comme des concepts de ressemblance familiale, ou concept de *clusters* (Pigliucci 2003b). Cette idée est issue des travaux de Ludwig Wittgenstein sur le langage (Wittgenstein 1953) : par exemple, le terme « jeu » n'étant définissable par aucune caractéristique commune à tous (i.e. il n'existe pas de propriété nécessaire et suffisante pour définir un jeu), on ne peut donc relier entre eux différents exemples de jeu que par un réseau complexe de similitudes et de relations, qui ne sont pas forcément les mêmes suivant les jeux que l'on considère (Figure 1). Ce type de pluralisme diffère des autres par le fait qu'il n'implique qu'un seul concept, non restrictif, alors que le pluralisme conceptuel englobe plusieurs concepts dépendant de la question posée.

Finalement, l'approche pluraliste est perçue par d'autres auteurs non comme une solution, mais plutôt comme un symptôme du problème de l'espèce, et ils restent donc sceptiques quant à sa résolution au cours des années à venir (Reydon 2004). Même le concept de clusters est une tentative d'élaboration d'un concept unificateur, donc *unique.* En fait, il semblerait que l'espèce ne corresponde pas à un, mais à plusieurs concepts scientifiques indépendants, élaborés dans des contextes de recherche différents (i.e. ontologiquement différents).

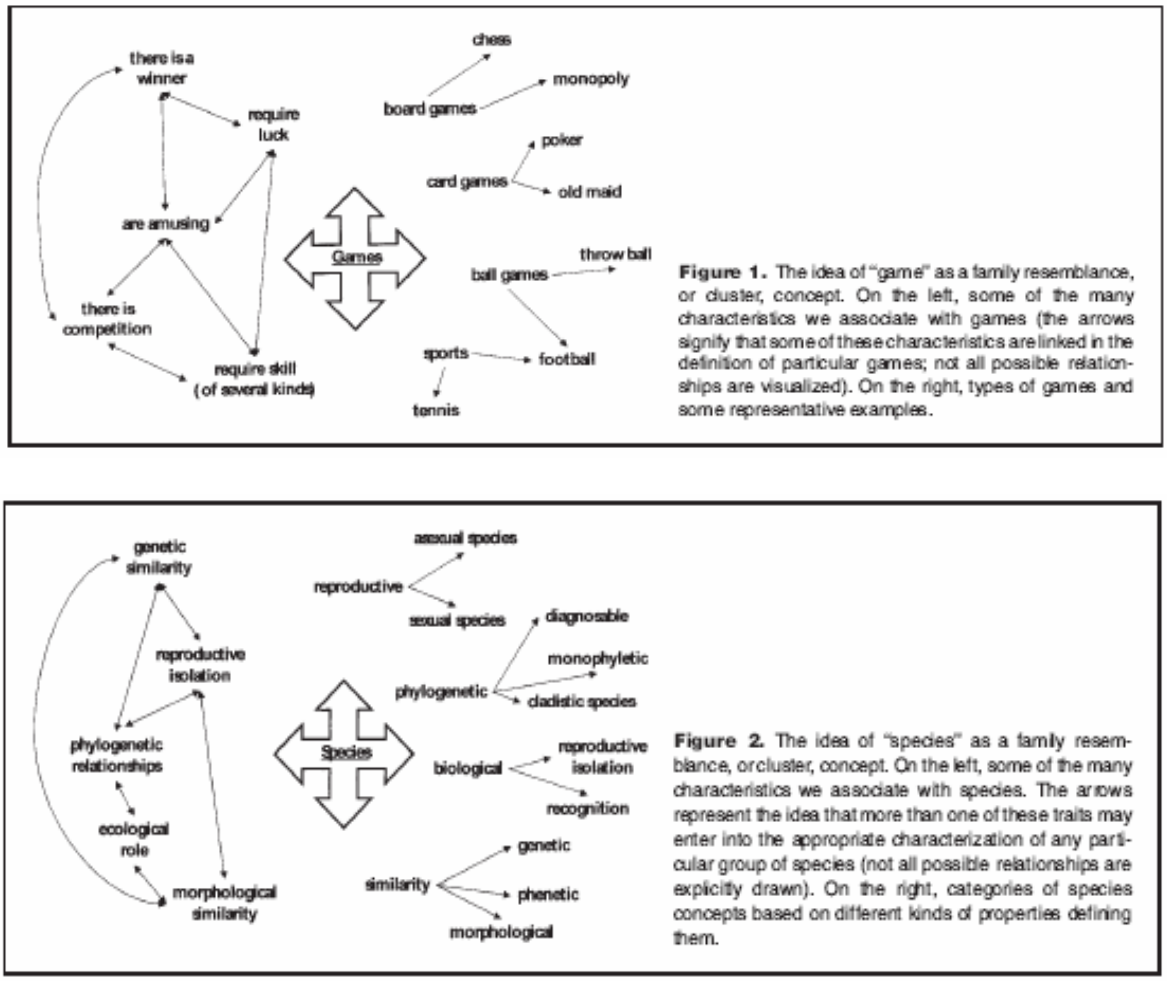


Figure 1. L'espèce comme concept de ressemblance familiale, par analogie au concept de jeu de Wittgenstein (tiré de Pigliucci, 2003).

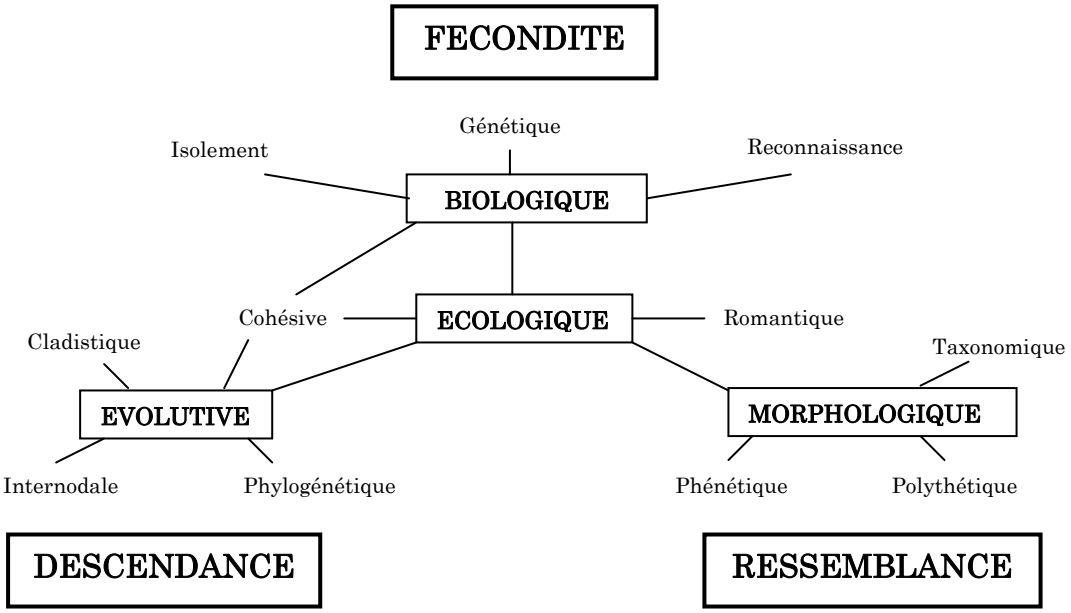


Figure 2. Principaux concepts en relation avec les composantes de l'espèce (tiré de Lherminier & Solignac, 2005)

Dans ce cas, il ne faut peut-être pas chercher à unifier des concepts qui ne sont pas nécessairement compatibles (i.e. ce sont des homonymes plutôt que des synonymes, une idée assez similaire est évoquée par [Hey et al. 2003]). Par exemple, Reydon (2005) en distingue quatre types (*evolveron* [BSC, CSC...], *phylon* [PSC…], *classe d'organismes* [MSC, PhSC…] et *classe d'evolverons* [Evolutionary Significant Unit…]), ayant été élaborés pour remplir trois rôles épistémologiques différents : la description de processus évolutifs (evolveron), la classification (phylon), et la généralisation (classes d'organismes et d'evolverons). La solution serait donc ailleurs que dans l'unification.

Une analyse assez similaire a été élaborée par Lherminier & Solignac (2005) : ils décrivent trois composantes permettant de décrire l'espèce : la ressemblance, la fécondité et la descendance. Ces fonctions entrent étonnamment en résonance avec la logique philosophique, puisqu'elles peuvent être mises en parallèle avec les catégories kantiennes de relation : inhérence (et subsistance)/ressemblance, causalité (et dépendance)/descendance et communauté (et réciprocité)/fécondité. Ces catégories sont indépendantes et ne sont pas démontrables l'une par l'autre, et tout concept d'espèce peut être défini par une combinaison et une modulation des trois (Figure 2). Les divers concepts expriment une même idée mais d'un point de vue différent, avec des critères propres à leur domaine d'application : parfois ils coïncident, parfois non. Par contre, il est impossible de trancher entre ressemblance, fécondité et descendance, et aucune notion ne peut les confondre. En conclusion, les auteurs distinguent trois degrés d'acquisition du savoir : l'observation minutieuse d'échantillons dans la nature, la conceptualisation et la généralisation en organisant ces observations (concepts objectifs et testables), et l'élaboration totalement subjective d'une idée (notion purement philosophique). L'espèce correspondrait donc simplement à une idée…

> « Dans tous les cas l'idée d'espèce énonce la règle et souligne l'exception. Or l'exception est décisive. C'est elle qui résout l'antinomie à laquelle on se heurte depuis deux siècles : ou l'espèce est réelle et l'évolution ne l'est pas, ou l'évolution est réelle et l'espèce ne l'est pas. Parce qu'on donne de l'espèce une valeur idéale on ne peut en concevoir la transformation. » (Lherminier & Solignac 2005, p 631)

Il semble donc, sans pouvoir se passer de l'espèce, qu'il faille en accepter les différentes facettes. Certains auteurs vont même jusqu'à demander un moratoire concernant les débats et les créations de nouveaux concepts d'espèce (Hey 2001b; Rundle et al. 2001). Il s'agit d'être clair et d'expliciter ce qu'on entend par la notion d'espèce, en fonction du point de vue où l'on se place et du domaine de recherche dans lequel on se situe. Une tâche difficile mais certainement cruciale consiste en outre à expliquer et faire admettre au grand public, aux

acteurs de la gestion et de la conservation de l'environnement les relations incertaines entre les hypothèses scientifiques et les réalités de la nature (Allendorf et al. 2001; Hey et al. 2003)…par exemple qu'un frêne oxyphylle puisse parfois étrangement ressembler à un frêne commun.

Sur le dossier gris était posée en guise de presse-papiers une pierre grise, d'un gris plus foncé, (oblongue) (ou plate) (ou arrondie) (selon le côté où on la regarde), bref une pierre grise aux formes irrégulières, à propos de laquelle on ne peut rien dire de rassurant (par exemple, que c'est un parallélépipède) (ou peu importe, mais quelque chose qui réconcilie si bien l'esprit humain avec les objets, sans qu'il les comprît en réalité, dès lors qu'ils correspondent au moins à la construction d'une figure, et qu'on peut les considérer comme classés) puisque cette pierre avec ses arrêtes, coins, pics, arrondis, rainures, fissures, saillies et bosselures existantes ou disparues était irrégulière, comme seule peut l'être une pierre dont on ne saura jamais si, au contraire, c'est le vestige d'un bloc plus important, lequel bloc à son tour faisait partie d'une unité encore plus grande (comme le rocher par rapport à la montagne) (finalement chaque pierre nous entraîne dans des réflexions paléontologiques) (ce qui n'est pas notre but) (mais il est difficile de résister) (surtout quand on a affaire à une pierre qui oriente notre imagination en faillite) (vers des origines, des fins, des densités, et des unités finales) (ou plutôt originelles) (pour nous renvoyer en définitive à notre ignorance impuissante) (mais parée de la soi-disant dignité du savoir concernant, comme beaucoup d'autres choses, cette pierre, dont on ne saura jamais si c'est un morceau détaché d'un rocher ou, au contraire, le vestige d'un bloc plus important).

IMRE KERTESZ, *Le refus* (1988)

II. ZONES HYBRIDES ET SPECIATION

Les zones hybrides, de par la nature incertaine des entités qui interagissent en leur sein, ont depuis longtemps intrigué les naturalistes. Si pendant des siècles elles ont plutôt mis mal à l'aise les taxonomistes parce qu'elles mettaient en péril les classifications établies, elles sont devenues très tôt au XXème siècle des centres d'intérêt importants (pour revue voir par exemple Arnold 1997; Howard et al. 2003). Elles sont en effet un outil privilégié pour étudier les processus de divergence entre lignées, et les mécanismes limitant les échanges génétiques pouvant aboutir à la spéciation, ou au contraire la rencontre d'entités plus ou moins différenciées (Hewitt 1988; Harrison 1990). Ces contacts secondaires peuvent d'ailleurs dans certains cas générer de nouvelles solutions évolutives par la mise en commun de fonds génétiques plus ou moins différenciés, conférant une valeur adaptative aux hybrides dans des habitats particuliers et pouvant même aboutir à l'émergence de nouvelles espèces (Bullini 1994; Rieseberg 1997; Seehausen 2004). Sur ce point, les visions ont été pendant longtemps divergentes, opposant en particulier zoologistes (Dobzhansky 1937; Mayr 1963) et botanistes (Anderson & Stebbins 1954). Les premiers ne concevaient l'hybridation que comme les conséquences d'une spéciation incomplète et donc représentant une étape avant l'établissement de barrières reproductives strictes, alors que les autres l'envisageaient comme source de variations.

1. Origine et biogéographie des zones hybrides

En général, il est très difficile de distinguer la divergence en parapatrie (contact primaire) du contact secondaire, car si la zone hybride est ancienne, les deux scénarios peuvent produire les mêmes motifs de variations (Endler 1977). En effet, il est important de différencier les facteurs qui ont conduit à la formation d'une zone hybride (contexte géographique et évolutif) des facteurs historiques et écologiques qui peuvent expliquer les distributions actuelles (Barton & Hewitt 1985). Seul un contact secondaire récent peut éventuellement être détecté par l'existence de clines concordants pour de nombreux caractères (morphologiques, comportementaux, marqueurs neutres, ADN cytoplasmique…), bien qu'une forte sélection disruptive sur de nombreux caractères (liés ou non) pourrait engendrer les mêmes motifs de variations *in situ* (Harrison 1990). Un indicateur de contacts secondaires souvent invoqué est

l'existence de zones hybrides entre de multiples couples d'espèces dans la même région géographique (Remington 1968), appelée zone de suture et caractérisée par des transitions climatiques ou géographiques importantes. Récemment, l'existence de telles zones en Amérique du Nord a été testée grâce au système d'information géographique et la compilation de données sur 117 zones hybrides, n'ayant permis de mettre en évidence que deux zones de suture sur les 13 décrites par Remington (Swenson & Howard 2004). Puis d'autres régions de suture ont été détectées en incluant des « cassures » phylogéographiques intra-spécifiques (i.e. des zones de rencontre entre populations différenciées de la même espèce, Swenson & Howard 2005). Dans le cas de zones hybrides aviaires, la température s'est révélée être un facteur déterminant pour expliquer leur formation et leur maintien (Swenson 2006). En Europe, la position des zones de suture a souvent été déduite des routes de colonisation post-glaciaires reconstruites grâce aux données paléobotaniques et phylogéographiques (Taberlet et al. 1998; Hewitt 1999, 2000, 2001), même si elles peuvent varier considérablement selon les espèces (Lascoux et al. 2004). La distribution actuelle de la diversité génétique et spécifique est le résultat de processus complexes d'extensions et de rétractions successives provoquées par les oscillations climatiques du Quaternaire (Hewitt 2004) : les refuges sont supposés être des centres de diversité, d'où sont parties beaucoup d'espèces pour recoloniser l'Europe et former des zones de forte diversité (Petit et al. 2003). Cependant, ce n'est pas toujours le cas pour les arbres forestiers : le hêtre montre une grande richesse allélique au sein des refuges mais la diversité génétique est plus faible qu'ailleurs (Comps et al. 2001; Widmer & Lexer 2001). Si les espèces ont suffisamment divergé en allopatrie, les régions « d'affrontement » peuvent former des zones hybrides étroites : c'est la cas par exemple des sauterelles *Chorthippus parallelus* et *C. curtipennis* dans les Pyrénées. La divergence entre les deux espèces étant estimée à environ 500 000 ans, elles auraient été séparées pendant quatre ou cinq cycles glaciaires, puis des lignées provenant des refuges hispaniques et d'Europe de l'Ouest se seraient rencontrés au niveau de la zone de suture formée par la chaîne de montagnes (Butlin 1998).

La modification d'habitats par l'homme peut également entraîner l'apparition de zones hybrides, en particulier chez les plantes : l'adaptation de violettes à des milieux pollués par hybridation récurrente (Neuffer et al. 1999), la disparition des barrières phénologiques entre les espèces de plantes à fleurs *Banksia hookeriana* et *B. prionotes* provoquée par un remaniement d'habitat (Lamont et al. 2003) et la formation d'une zone hybride entre des espèces de plantes *Rorippa* spp. suite au creusement de fosses de drainage (Bleeker & Hurka 2001) en sont quelques exemples. Les activités humaines peuvent également mettre en contact

des populations auparavant séparées par la création de corridors (McDonnell et al. 1978; Harrison & Arnold 1982).

2. Isolement reproducteur

On peut discerner trois types d'isolement reproducteur : pré-zygotique, zygotique et post-zygotique. La première catégorie peut même être divisée en deux : pré-copulatoire et post-copulatoire. En fait, l'isolement reproducteur peut agir à chaque étape de la reproduction et du développement (pour revue voir Coyne & Orr 2004).

2.1. Isolement zygotique et post-zygotique

L'isolement zygotique est provoqué par des incompatibilités génomiques ou physiologiques empêchant la méïose de se réaliser correctement.

L'isolement post-zygotique se traduit par une diminution de la fertilité ou de la viabilité des hybrides, et résulte souvent d'incompatibilités génétiques. L'isolement reproducteur extrinsèque est caractérisé par une faible viabilité et/ou fertilité des hybrides mal adaptés aux environnements parentaux. L'isolement intrinsèque fait l'objet d'un nombre croissant d'études, et est caractérisé par des incompatibilités génétiques (voir par exemple Orr & Presgraves 2000) : remaniements chromosomiques, différences de degrés de ploïdie, et/ou incompatibilités épistatiques (type Dobzhansky-Müller, Orr 1996). Lorsque la viabilité n'est réduite que chez l'un des deux sexes, c'est très souvent le sexe hétérogamétique qui est affecté (règle de Haldane, Coyne 1992). Un des gènes de spéciation les mieux étudiés est le gène à homéobox *Odysseus* (OdsH) de la drosophile, impliqué dans la maturation du sperme et qui entraîne une stérilité mâle chez les hybrides par des défauts de régulation (Sun et al. 2004). Un autre mécanisme d'isolement est provoqué par des incompatibilités cytoplasmiques, par exemple dû à l'infection d'endosymbiontes comme *Wolbacchia* chez les insectes.

2.2. Isolement pré-zygotique

Isolement intrinsèque

L'isolement intrinsèque peut être comportemental : la sélection disruptive peut entraîner la divergence de préférences sexuelles ou de traits reproducteurs. Les préférences sexuelles peuvent être sélectionnées directement si elles confèrent une augmentation de valeur sélective (par exemple une femelle qui préfère un trait porté par un mâle ayant le meilleur territoire), ou indirectement par corrélation génétique. Dans ce dernier cas, ce n'est pas la préférence de la femelle qui est directement sélectionnée : si un trait est soumis à sélection disruptive chez les mâles, les femelles qui vont préférer ce trait vont produire plus de descendants mâles ayant une bonne valeur sélective (elles auront donc une meilleure valeur sélective), et par corrélation génétique des femelles qui préfèrent le trait. Ce mécanisme peut s'auto-amplifier très rapidement et mener à la spéciation (*Fisher's runaway sexual selection*, Lande 1981). L'isolement comportemental peut se faire également sans nécessairement impliquer de mécanisme génétique : si les populations sont assez isolées, il peut y avoir divergence par « dérive comportementale ». Cela peut concerner par exemple des divergences de chants chez des oiseaux en allopatrie (voir exemples cités dans Coyne & Orr 2004).

L'isolement intrinsèque peut être également mécanique, dû à l'incompatibilité entre les structures reproductrices des deux espèces. Ce mécanisme peut évoluer par dérive ou par sélection, si les gènes qui contrôlent le développement de ces structures ont de larges effets.

Enfin, l'isolement intrinsèque peut être dû à l'isolement gamétique : soit par incompatibilité gamétique (par exemple intrinsèque en provoquant des défauts physiologiques ou biochimiques de reconnaissance des gamètes lors de la fécondation) ou par compétition gamétique, également appelée priorité pollinique ou spermatique conspécifique (pour revue voir Howard 1999). Ce dernier mécanisme peut être détecté lorsque la proportion d'hybrides produits lors de croisements mixtes est inférieure à la proportion de descendants produits lors de croisements hétérospécifiques seuls par rapport à des croisements conspécifiques seuls. Cela peut être dû à une moindre mobilité ou viabilité des gamètes hétérospécifiques par rapport aux gamètes conspécifiques. Par exemple, la mobilité des gamètes hétérospécifiques est réduite chez le criquet *Allonemobius*, ce qui constitue une barrière importante aux flux géniques en zone hybride (Howard et al. 1998). Chez les moules, ce mécanisme semble également important pour limiter les flux de gènes (Bierne et al. 2002a). Chez les plantes, une

priorité pollinique conspécifique a été détectée chez *Mimulus* (Diaz & Macnair 1999), chez *Iris* (Carney et al. 1996) et chez les tournesols *Helianthus* (Rieseberg et al. 1995), s'avérant être le résultat d'une croissance plus lente du tube pollinique pour les deux premiers. Dans les trois cas, les espèces fleurissent à peu près en même temps et ce mécanisme représente donc une barrière importante aux flux de gènes en zone hybride. Chez les arbres forestiers, une priorité pollinique partielle a été détectée chez les chênes américains *Quercus gambelii* et *Q. grisea*, mais certains arbres de l'espèce *Q. gambelii* produisent beaucoup de graines hybrides, ce qui peut être expliqué par un stress environnemental qui augmenterait la production d'hybrides en diminuant la compétition pollinique (Williams et al. 2001). Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer l'évolution de la priorité gamétique : la réponse aux pathogènes, la sélection sexuelle, le conflit sexuel (par rapport au choix de la femelle ou à l'évitement de la polygamie), le renforcement et l'évolution concertée, mais il est souvent difficile de les valider (Howard 1999). Par exemple dans le cadre de la première hypothèse, les protéines de surface de l'ovule qui interviennent dans la reconnaissance gamétique pourraient être les mêmes que celles qui permettent la défense contre les pathogènes, dans des environnements où la charge parasitaire sur les œufs peut être importante.

Isolement écologique

L'isolement reproducteur pré-zygotique peut avoir une composante écologique (pour revue voir par exemple Rundle & Nosil 2005). Le premier type est l'isolement d'habitat lorsque les espèces occupent des habitats très différents, ce qui peut limiter considérablement les flux géniques dans le cas de parasites ou d'insectes phytophages qui se reproduisent sur des hôtes différents. Ce type de mécanisme peut devenir très important s'il y a sélection contre les immigrants dans chaque habitat (Nosil et al. 2005).

Un autre type d'isolement écologique chez les plantes fait intervenir les pollinisateurs : des couples d'espèces peuvent présenter des guildes de pollinisateurs différentes, pour des raisons mécaniques ou éthologiques (voir par exemple Grant 1994). Ce mécanisme peut être très efficace, en particulier lorsqu'il ne fait intervenir que quelques gènes : par exemple, chez *Mimulus*, une mutation sur le gène *Yellow Upper* (Yup) suffit à provoquer une inversion du type de pollinisateur des deux espèces (bourdons et colibris) [Bradshaw & Schemske 2003]. Il semble par contre que ce type de mécanisme ait une plus grande probabilité d'apparaître en allopatrie ou en parapatrie qu'en sympatrie, en particulier parce que les nouveaux pollinisateurs doivent être accessibles lorsque la mutation apparaît.

Enfin, le dernier mécanisme d'isolement écologique est l'isolement temporel. En principe, il est le seul à pouvoir mener par lui-même à la spéciation sympatrique : il peut générer une barrière reproductive entre deux espèces sympatriques ayant des exigences écologiques identiques (Coyne & Orr 2004). Chez les animaux, il existe lorsque les populations observent des différences de période ou de saison de reproduction, ou de ponte. Par exemple, chez le saumon nord-américain *Oncorhynchus nerka*, les individus se reproduisant tôt sont génétiquement différenciés de ceux qui se reproduisent tard, et la variation de saison de reproduction est corrélée à une variation de durée de vie post-reproduction, ce qui peut être expliqué par un *trade-off* permettant aux femelles se reproduisant tôt de protéger efficacement leur descendance (Hendry et al. 2004). Chez les plantes, ce mécanisme implique des différences de date de floraison ou des décalages des différentes étapes de la floraison. En effet, même si les périodes de floraison sont les mêmes au sein d'une population, les croisements ne se font pas forcément au hasard si le déroulement de toutes les étapes du développement floral diffère : par exemple la date de pollinisation, la date du pic de floraison, la distribution temporelle de la quantité de fleurs produites… (*cryptic assortative mating*, Fox 2003; Weis & Kossler 2004; Weis 2005).

La mise en évidence de l'isolement temporel comme cause première de barrière aux flux de gènes entre espèces n'est pas aisée. Il est souvent difficile d'appréhender son importance relative dans la divergence lorsque les espèces montrent d'autres types d'isolement : certains auteurs pensent d'ailleurs que l'isolement phénologique chez les plantes ne joue qu'un faible rôle dans la limitation des flux géniques, comparé à d'autres facteurs comme les pollinisateurs ou l'habitat (Rathcke & Lacey 1985). Chez des espèces sympatriques de saules nord-américains, la barrière phénologique semble être la plus importante, puisque ces espèces proches partagent le même environnement et les mêmes pollinisateurs. Cependant, les hybrides entre espèces fleurissant en même temps existent très peu dans la nature, ce qui suggère également l'existence d'une forte barrière post-zygotique (Mosseler & Papadopol 1989). Chez des espèces de *Banksia* australiennes, la barrière phénologique a disparu suite à un remaniement d'habitat qui a eu pour effet d'augmenter la production de fleurs et la période de floraison de chaque espèce, et par conséquent de leur permettre de s'hybrider (Lamont et al. 2003). Dans ce cas, la barrière phénologique était très importante puisque sa disparition a entraîné la formation d'un grand nombre d'hybrides.

Il semble quand même que l'isolement phénologique ait une grande importance dans l'évolution des populations, de par le simple fait qu'il empêche les croisements au hasard, et

que la phénologie est en général fortement héritable (Weis & Kossler 2004; Hendry & Day 2005). Certains auteurs pensent d'ailleurs qu'il est ubiquitaire chez les plantes, y compris au sein de populations de la même espèce (Fox 2003; Weis & Kossler 2004). Il peut être directement soumis à sélection, mais des corrélations génétiques entre la phénologie et des traits adaptatifs peuvent vite apparaître (Weis 2005). De fait, le principal effet des croisements préférentiels dus à la phénologie étant l'apparition d'un déficit en hétérozygote, ils peuvent par exemple augmenter la vitesse de réponse à la sélection directionnelle, ou l'efficacité de la sélection disruptive (Fox 2003; Weis et al. 2005). Les variations de phénologie florale sont souvent corrélées à des gradients de température, ce qui peut suggérer l'existence d'une sélection directe sur ce trait (voir par exemple pour les arbres Chuine et al. 2000) : les changements climatiques semblent avoir avancé la date de floraison de beaucoup d'espèces de plantes en Grande-Bretagne (Fitter & Fitter 2002). Par ailleurs, les études de sélection sur la date de floraison chez *Arabidopsis* détectent en général un fort potentiel de réponse à la sélection pour ce caractère (voir pour revue Pigliucci 2003a). En population naturelle, le cas de *Mimulus* est un exemple de sélection directe (Macnair & Gardner 1998, voir plus haut).

Deux types de mécanismes génétiques peuvent être impliqués dans l'isolement reproducteur phénologique (Kirkpatrick & Ravigné 2002): le type 1-allèle, où le même allèle entraîne les croisements préférentiels dans les deux populations (par exemple un gène qui diminue le *temps* de floraison, ou qui augmente le nombre d'évènements reproductifs entre individu identiques) ; et le type 2-allèles où chaque allèle se répand dans une des deux populations (par exemple un allèle qui diminue la *date* de floraison dans une population et l'autre qui l'augmente ailleurs) [Felsenstein 1981]. L'hybridation ne pourra éventuellement diminuer l'isolement reproducteur que dans le cas du type 2-allèles.

Un dernier aspect concerne la possibilité de renforcement (voir plus bas) de l'isolement phénologique en sympatrie. Caisse & Antonovics (1978) montrent que le renforcement est théoriquement possible si les allèles d'isolement sont neutres hors de la zone contact : son existence sera détectable par des clines inverses en bord de zone. Les exemples allant dans ce sens ne sont pas nombreux: des populations des espèces *Agrostis tenuis* et *Anthoxanthum odoratum* poussant sur des sols différemment chargés en métaux montrent un déplacement de date de floraison en bord de mine (McNeilly & Antonovics 1968). Récemment, l'analyse de l'évolution de la date de floraison dans un jardin expérimental sur un siècle et demi a montré l'apparition de clines inverses au niveau des bordures de parcelles où des plantes de la même espèce poussaient sur des milieux très différents (Silvertown et al. 2005). Un autre signe de renforcement peut être la plus forte divergence de date de floraison en sympatrie qu'en

allopatrie : par exemple, Petit et al. (1997) ne détectent pas cette différence dans une zone de contact entre des diploïdes et des tétraploïdes d'*Arrhenatherum elatius*, ce qui ne plaide pas en faveur du renforcement. Il est enfin intéressant de noter que la divergence de date de floraison peut théoriquement s'auto-amplifier à partir d'une petite différence environnementale au départ, sans que ce caractère ne soit sélectionné, mais simplement par migration « préférentielle » (Stam 1983). L'existence de la sélection n'est peut être donc pas à invoquer dans tous les cas.

3. Dynamique et évolution des zones hybrides

Le devenir des zones hybrides dépend en grande partie des effets relatifs de la migration et de la sélection, cette dernière pouvant avoir plusieurs origines, en particulier endogène (diminution de valeur sélective intrinsèque des génotypes hybrides) et exogène (adaptation à des environnements différents) [Barton 2001].

3.1. Fusion des espèces

Disparition de la zone hybride

Une des possibilités est la fusion des populations différenciées mises en contact. Théoriquement, l'avènement d'une telle fusion va dépendre de la force de la sélection contre les hybrides, du taux de recombinaison, du taux de migration et du nombre de loci impliqués dans l'isolement reproducteur (Barton & Bengtsson 1986). Par exemple, si la sélection est faible par rapport au taux de recombinaison, la rapidité d'introgression va dépendre de la sélection s'exerçant sur chaque locus indépendamment. Si le nombre de loci impliqués dans l'isolement reproducteur est faible, la fusion peut être rapide. La fusion est difficile à mettre en évidence en milieu naturel sans un suivi à long terme des zones hybrides. Un cas intéressant est illustré par des sous-espèces d'épinoches, dont les barrières reproductives sont fragiles et qui ont divergé par spécialisation d'habitat : l'analyse de données génétiques et morphologiques récoltées sur 25 ans a mis en évidence une très forte augmentation du taux d'hybridation, menant à la formation de nombreux d'hybrides. Ceci est corrélé à l'introduction d'une espèce envahissante de langoustes qui aurait pu modifier l'habitat et/ou provoquer une diminution drastique des populations parentales par augmentation de la prédation (Taylor et al. 2005; Gow et al. 2006).

Spéciation hybride

L'origine hybride de beaucoup d'espèces a pu être mis en évidence (Bullini 1994; Rieseberg 1997; Seehausen 2004) : cela semble être le cas par exemple d'une espèce de souris japonaise qui résulterait de la fusion d'espèces chinoise et japonaise (Berry & Scriven 2005). Le premier mécanisme de spéciation hybride est la polyploïdie, beaucoup plus répandue dans le règne végétal qu'animal (pour revue voir Otto & Whitton 2000 ; chez les plantes, voir Ramsey & Schemske 1998; Levin 2002; Ramsey & Schemske 2002). Théoriquement, la polyploïdie doit pouvoir entraîner une spéciation très rapide si les hybrides sont viables et ont accès à certaines ressources disponibles non exploitées par les espèces parentales : en effet, l'accroissement du nombre de chromosomes doit provoquer des défauts de méiose lors de rétro-croisements, et donc faire apparaître un isolement reproducteur complet presque immédiatement.

L'autre mécanisme de spéciation hybride, la spéciation homoploïde, dont le modèle recombinant est le plus largement accepté, a été beaucoup moins étudié car plus difficilement détectable (Rieseberg & Carney 1998; Rieseberg 2001). Si les espèces parentales diffèrent par des réarrangements chromosomiques, les hybrides en général sont peu fertiles, mais la recombinaison au cours des générations suivantes peut produire des individus homozygotes pour certaines régions génomiques qui diffèrent chez les espèces parentales. La nouvelle lignée hybride sera alors fertile et les incompatibilités génomiques limiteront les échanges de gènes avec les espèces parentales (Rieseberg 1997). Les facteurs semblant être prépondérants pour ce type de scénario sont une forte sélection favorisant les recombinants, un nombre peu élevé de différences chromosomiques (McCarthy et al. 1995), une évolution chromosomique rapide, et l'accessibilité à des habitats « vides » (Buerkle et al. 2000). L'expression de caractères transgressifs (due par exemple à l'expression d'allèles récessifs rares et/ou de l'action complémentaire de gènes présents chez les espèces parentales) peut aider à la divergence d'habitat des lignées hybrides (Rieseberg & Ellstrand 1993; Rieseberg et al. 1999a). L'exemple le plus connu de spéciation recombinante concerne des espèces de tournesol d'Amérique du Nord : *Helianthus petiolaris* et *H. annuus* diffèrent par une dizaine de réarrangements chromosomiques, s'hybrident en populations naturelles et forment des « essaims d'hybrides », malgré la faible fertilité des F1. Vingt-six segments chromosomiques montrent des taux d'introgression au sein de trois zones hybrides différant significativement des taux attendus sous l'hypothèse de neutralité, dont 50% appartenant à des réarrangements (Rieseberg et al. 1999b). Malgré cela, au moins trois autres espèces sont soupçonnées d'être

issues de spéciation hybride entre *H. petiolaris* et *H. annuus*, dont *H. anomalus*, qui diffèrent écologiquement des parents. En laboratoire, trois lignées hybrides indépendantes ont pu être créées en serre, dont la composition génétique s'est avérée être très proche de celle d'*H. anomalus* (Rieseberg et al. 1996). De plus, plusieurs traits phénotypiques caractéristiques des trois espèces hybrides ont pu réapparaître dans des lignées synthétiques, semblant bien être le résultat d'interactions génétiques spécifiques (Rieseberg et al. 2003). L'ensemble ces travaux montrent qu'il est possible qu'une lignée hybride soit stabilisée en quelques générations, exprimant des caractères transgressifs pouvant procurer de nouvelles adaptations. Chez les arbres forestiers, l'un des seuls exemples actuellement décrits concerne une espèce de pin tibétain, *Pinus densata*, qui semblerait résulter de spéciation hybride entre deux espèces parentales de plus basse altitude (Wang et al. 2001; Song et al. 2002). Par une série de goulets d'étranglement et de rétro-croisements successifs, l'espèce hybride aurait colonisé un espace de haute altitude non occupé par les espèces parentales (Song et al. 2003).

Invasion, extinction

Dans certains cas, l'hybridation naturelle entre deux espèces peut vite mener à l'extinction de l'une d'entre elles, particulièrement si celle-ci est rare et composée de populations de faibles tailles (Levin et al. 1996). De fait, l'hybridation peut avoir un rôle très important dans l'invasion d'espèces introduites (Rhymer & Simberloff 1996; Ellstrand & Schierenbeck 2000) par exemple par l'expression de caractères transgressifs ou l'introgression d'allèles adaptatifs (Facon et al. 2006). L'hybridation peut permettre d'accroître le potentiel envahissant d'une espèce par une augmentation de la valeur phénotypique moyenne (hétérosis) et/ou de la variance phénotypique (permettant de restaurer l'effet de la sélection lors de forts effets fondateurs). Par exemple, l'hybridation chez le gastéropode introduit *Melanoides tuberculata* a permis, grâce à un effet d'hétérosis immédiat, d'envahir rapidement les eaux douces de Martinique (Facon et al. 2005). D'autres exemples d'espèces d'eau douce concernent des écrevisses en Amérique du Nord, où une espèce introduite est en train de remplacer deux espèces résidantes (Perry et al. 2001), et une espèce de Cyprinidae tendant à s'accroître au sein d'une zone hybride mosaïque avec une espèce endémique, dans le Sud de la France (Costedoat et al. 2005).

3.2. Stabilité des zones hybrides

Beaucoup de zones hybrides ont été perçues comme étant stables, au moins pendant un temps assez long où les paramètres de l'environnement fluctuent peu. Les conditions permettant ce maintien ont longtemps intrigué les naturalistes, ce qui a permis de générer plusieurs modèles de zones hybrides stables, pouvant cependant varier dans le temps et l'espace.

Le premier modèle décrit, lié à l'idée que l'hybridation est liée à l'existence d'une spéciation incomplète, a été le concept de *zone de tension* (Key 1968). Ces zones peuvent être maintenues par un équilibre entre dispersion des génotypes parentaux à l'intérieur de la zone et la contre-sélection des hybrides maladaptés. Elles forment un cline étroit entre deux populations homogènes, qui pour un locus a une largeur proportionnelle à $\sqrt{\sigma^2 / s}$, où σ^2 est la variance de la distribution de la dispersion et s est la force de la sélection (Slatkin 1973; Barton & Hewitt 1985). En théorie, la forme des clines (mono ou multilocus) est théoriquement la même, que la sélection contre les hybrides soit due à des incompatibilités génomiques ou à l'adaptation des populations parentales à des environnements différents de chaque côté d'un écotone (Kruuk et al. 1999). Observer des clines concordants entre plusieurs marqueurs implique que la sélection soit très intense et agisse sur tous les loci comme sur une seule unité génomique. Cependant, si les populations parentales ont des fréquences alléliques très différentes, la migration dans la zone hybride doit contribuer au maintien d'un fort déséquilibre de liaison, et créer une forte covariance génétique entre traits quantitatifs, ce qui peut produire des clines concordants, même entre loci non liés. L'intensité du déséquilibre de liaison peut d'ailleurs permettre d'estimer la dispersion en zone hybride (Barton & Gale 1993; Barton 2000). Mais théoriquement, des clines non concordants peuvent apparaître dans ce type de zone par l'intermédiaire d'une sélection épistatique ne favorisant qu'un seul type d'hybrides, ceux-ci servant de « pont » aux flux de gènes (Gavrilets 1997). Par contre, dans certaines conditions, les mutations délétères présentes au sein des populations parentales pourraient engendrer par recombinaison de l'hétérosis en zone hybride, et de ce fait augmenter la migration efficace et diminuer le déséquilibre de liaison et les barrières aux flux géniques (Bierne et al. 2002c). Si la recombinaison est significative, elle risque de réduire la cohésion de blocs génomiques, ce qui peut être utilisé pour dater la spéciation hybride (voir plus haut, Ungerer et al. 1998). De nombreux exemples de zones de tension semblant être

stables existent dans la nature (Barton & Hewitt 1985). L'un des cas les plus documentés est la zone hybride entre deux espèces de crapauds *Bombina* en Pologne, formée d'un cline étroit concordant pour de nombreux marqueurs, et maintenue par des incompatibilités génomiques rendant les hybrides peu viables. De plus, elle semble être restée stable sur une période de plus de 50 ans (Szymura & Barton 1986, 1991). Par ailleurs, certaines configurations géographiques de zones de tension impliquent qu'elles soient restées stables depuis les dernières glaciations (Hewitt 1988; Harrison 1990).

Lorsque les espèces parentales sont adaptées à des habitats différents, il est tout de même rare de les retrouver de chaque côté d'une zone de contact étroite. Le modèle de *zone hybride mosaïque* a donc été décrit comme représentant une mosaïque d'habitats structurés où les espèces parentales cohabitent avec des hybrides (Harrison 1986; Howard 1986; Rand & Harrison 1989). La structure et l'évolution de ces zones vont dépendre de la migration entre les patchs par rapport à leur taille, de la valeur sélective des hybrides et de l'histoire de la zone. Les conditions de maintien sont certainement très particulières, car cette structure peut potentiellement augmenter le contact entre espèces parentales, et donc la probabilité de fusion ou au contraire le renforcement de l'isolement reproducteur (Cain et al. 1999), par rapport à une structure clinale. Deux exemples bien documentés concernent des criquets d'Amérique du Nord, *Allonemobius,* dont les populations parentales mixtes forment un patchwork lié aux conditions climatiques (Howard 1986; Howard & Waring 1991) et *Gryllus*, dont la distribution des populations parentales est liée aux types de sols (Harrison 1986, 1990). Une étude récente analysant des données issues de 14 années d'observations montre que certaines zones sont stables, et que l'isolement reproducteur au sein des populations mixtes reste fort et constant (Britch et al. 2001). En milieu marin, les longues distances de dispersion larvaire doivent être compensées par une forte sélection locale pour maintenir une structure en mosaïque : chez les moules *Mytilus edulis et M. galloprovincialis*, la forte spécialisation d'habitat, la fertilisation préférentielle, la dépression hybride et la ponte asynchrone pourraient contribuer à maintenir une zone hybride mosaïque malgré de longues distances de dispersion et un environnement très hétérogène (grains fins) [Bierne et al. 2002a; Bierne et al. 2002b; Bierne et al. 2003]. Chez les crapauds *Bombina* en Roumanie, l'absence de croisements préférentiels semble être compensée par une forte préférence d'habitat et de site de reproduction. De fait, l'absence de croisements préférentiels semble avoir permis le mélange de caractères neutres (Vines et al. 2003; Nürnberger et al. 2005).

Un autre type de zone hybride avait été décrit assez tôt, les *zones hybrides marginales* (Moore 1977). Dans ce modèle, les populations parentales, adaptées à des environnements différents, seraient séparées par une zone de contact plus ou moins étroite où les hybrides seraient mieux adaptés que les parents, alors qu'ils le sont moins dans les habitats parentaux. Ce type de structure pourrait émerger du fait de l'existence de gradients écologiques, mais permettraient plutôt de décrire des zones hybrides apparues après des remaniements d'habitats par l'homme. Peu d'exemples en accord avec ce modèle ont été décrits. Le mieux documenté concerne *Artemisia tridentata*, mais une étude à long terme de transplantations réciproques montre une hétérogénéité de valeur sélective des hybrides dans les différents habitats (Miglia et al. 2005). Un autre exemple concerne des espèces de mouettes, dont les hybrides semblent mieux adaptés à l'intérieur de la zone de contact, au sein de laquelle ils présentent une survie et une fécondité accrues par rapport aux espèces parentales (Good et al. 2000). Il est relativement aisé, dans ce cas, d'imaginer que la zone hybide puisse facilement se maintenir si l'environnement ne fluctue pas trop.

Néanmoins, ces trois modèles ne permettent pas de décrire toutes les zones hybrides (par exemple Emms & Arnold 1997). Dans le cas des *Iris* de Louisiane, les espèces parentales et différents types d'hybrides montrent des variations de valeur sélective importantes selon différents types d'habitats : les hybrides sont mieux adaptés que les parents dans certains milieux, dans d'autres non, ce qui génère des distributions complexes des espèces parentes et des différents types d'hybrides, ayant souvent des guildes de pollinisateurs différentes (Arnold 1997; Arnold & Emms 1998).

S'il est possible de détecter les processus limitant des échanges de gènes au sein des zones hybrides, il apparaît souvent difficile de prévoir leur maintien, à moins de réaliser des études à très long terme.

3.3. Mouvement des zones hybrides

S'appuyant sur la théorie d'évolution des populations par changement de pic adaptatif (*shifting-balance*, Wright 1932), Barton & Hewitt (1989) montrent qu'il est possible que les zones hybrides clinales se déplacent : certaines populations vont diverger par dérive et vont « remonter » un nouveau pic adaptatif leur conférant une meilleure valeur sélective que les autres populations. Elles vont ensuite « tirer » l'ensemble de l'espèce vers ce nouveau pic adaptatif par l'intermédiaire de la migration inter-dèmes. Si l'une des espèces en contact

augmente en densité de cette façon et s'étend, la zone hybride peut se déplacer du côté de l'autre espèce. Le processus peut être rapidement amplifié si les allèles conférant la meilleure adaptation sont dominants (*dominance drive*). Un exemple qui pourrait correspondre à ce type de processus concerne des papillons des genres *Anartia* et *Heliconius* en Amérique Centrale, dont le déplacement de la zone hybride pourrait suggérer qu'elle se trouve dans la dernière phase de la *shifting-balance* (Blum 2002; Dasmahapatra et al. 2002). Là aussi, le déplacement pourrait être du à l'intervention de l'homme : certaines populations d'une espèce se seraient adaptées aux milieux ouverts par la déforestation. Dans une zone hybride aviaire d'Amérique du Nord, le déplacement pourrait être expliqué par un changement de comportement sexuel des femelles d'une espèce s'accouplant avec les mâles dominants de l'autre espèce lorsqu'elles assistent à des affrontements inter-spécifiques (Bronson et al. 2003). Une zone hybride des criquets *Allonemobius* s'est déplacée le long d'un transect dans les Appalaches, peut-être en partie sous l'effet des changements climatiques (Britch et al. 2001).

3.4. Divergence des espèces

Une des questions centrales autour de l'étude des zones hybrides concerne les conditions selon lesquelles le contact peut évoluer vers la divergence et l'isolement reproducteur complet des deux lignées. Ceci correspond à la spéciation parapatrique (pour revue, voir par exemple Coyne & Orr 2004). Si les deux espèces en contact sont adaptées à des habitats très différents, la mal adaptation des hybrides et l'isolement géographique peuvent aider à la divergence écologique et à l'augmentation de l'isolement reproducteur jusqu'à ce que les flux de gènes cessent. La dérive et la sélection contre les migrants dans chaque espèce (voir pour revue Nosil et al. 2005) peuvent contribuer à la divergence. Par ailleurs, les conditions sont susceptibles d'être différentes selon que la transition est clinale ou en *stepping-stone* (par exemple la dérive aura un rôle plus important dans le dernier cas, Coyne & Orr 2004)

3.5. Renforcement

Le renforcement (ou Effet Wallace) a été l'objet de controverses pendant longtemps, et a eu une histoire relativement chaotique. L'hypothèse du renforcement postule que lorsque deux espèces ont divergé en allopatrie et qu'un début d'isolement reproducteur est apparu, le contact secondaire, par l'intermédiaire de la contre-sélection des hybrides, va entraîner la sélection de caractères permettant d'augmenter la fréquence des croisements préférentiels.

L'isolement reproducteur pré-zygotique va être renforcé et la spéciation accélérée (Dobzhansky 1937). Les principales critiques au renforcement ont porté sur : le rôle antagoniste de la recombinaison et de la sélection favorisant l'isolement ; les risques d'extinction d'une des espèces avant que l'isolement ne soit complet ; la dispersion des allèles sélectionnés pour le renforcement dans les populations parentales ; le rétro-effet négatif de la diminution de fréquence des hybrides qui tend à diminuer la force du renforcement ; et le fait de favoriser l'isolement pré-zygotique alors que le coût de l'hybridation pourrait être contre-carré par l'augmentation de valeur sélective des hybrides (critiqués d'abord par Howard 1993, puis voir Servedio & Noor 2003; Coyne & Orr 2004).

A la fin du XX^{éme} siècle, des données expérimentales et des observations en populations naturelles ont revitalisé l'idée du renforcement. En particulier deux expériences importantes ont montré qu'il était possible de faire apparaître un isolement reproducteur chez la drosophile en quelques générations, en appliquant un régime sélectif disruptif direct (Thoday & Gibson 1962) ou indirect (Rice & Salt 1990). D'autre part, un certain nombre de couples d'espèces ont montré un isolement reproducteur plus fort en sympatrie, ce qui peut suggérer le renforcement (par exemple pour la drosophile voir Coyne & Orr 1997), mais des hypothèses alternatives existent en général. Par la suite, plusieurs modèles théoriques ont précisé les conditions dans lesquelles le renforcement était possible, ne s'avérant pas si restrictive qu'on le pensait auparavant (par exemple Liou & Price 1994; Kirkpatrick & Servedio 1999; Servedio 2001).

Lorsqu'il y a sélection disruptive sur des caractères conférant des adaptations à des environnements différents, il est difficile de savoir quel peut être le mécanisme transférant la force de la sélection à l'isolement reproducteur (Kirkpatrick & Ravigné 2002). Deux solutions sont possibles : une sélection indirecte (renforcement) ou directe, agissant sur le caractère reproducteur en lui-même. Le cas le plus simple à imaginer pour ce dernier cas est une sélection sur la date de floraison chez les plantes (Slatkin 1982). Un joli exemple concerne *Mimulus*, dont les populations ayant colonisé des sols chargés en serpentine fleurissent plus tôt que leurs voisines, en réponse à l'assèchement précoce de ces sols, ce qui leur permet de fleurir avant de flétrir (Macnair & Gardner 1998).

III. HYBRIDATION CHEZ LES ARBRES FORESTIERS

Etant donnés leur longue durée de vie, leurs distributions souvent très étendues, les longues distances de dipersion de pollen et les forts taux d'allofécondation, les arbres forestiers montrent souvent de larges zones de contact entre espèces. Si l'hybridation naturelle a été mise en évidence chez de nombreuses espèces, elle n'a pas les mêmes conséquences à chaque fois. Parfois, même lorsque l'hybridation existe dans une large zone de contact, les espèces parentales restent distinctes morphologiquement, en partie du fait d'une forte adaptation locale. L'un des exemples les plus documentés concerne les chênes blancs Européens *Quercus robur* et *Q. petraea* : l'analyse morphologique d'un ensemble de populations mixtes Européennes révèle une constante différentiation entre les deux espèces et une distribution bimodale des variables morphologiques synthétiques (Kremer et al. 2002). Par ailleurs, les espèces sont clairement différenciées génétiquement à l'échelle de l'Europe et très peu d'individus ne sont pas assignables à l'une ou l'autre espèce (Muir et al. 2000). Malgré les flux de gènes apparemment très importants entre les deux espèces (Bacilieri et al. 1996; Streiff et al. 1999), il semble que le polymorphisme partagé entre les deux espèces soit plutôt ancestral, et la faible fréquence d'hybrides en populations naturelles pourrait être expliquée par un fort isolement post-zygotique (Muir & Schlötterer 2004). Des résultats similaires ont été obtenus sur des espèces de chênes américains (Whittemore & Schaal 1991; Howard et al. 1997; Craft et al. 2002; Tovar-Sanchez & Oyama 2004) et espagnoles (Valbuena-Carabaña et al. 2005) : les hybrides en populations naturelles sont rares et les espèces sont souvent distinctes. La situation semble être par contre un peu différente chez les chênes rouges d'Amérique du Nord : si les espèces restent distinctes dans certaines populations mixtes, les taux d'hybridation dans d'autres populations sont assez élevés, et sont fortement corrélés aux variations climatiques (Dodd & Afzal-Rafii 2004). Si la production d'hybrides viables est significative chez les chênes blancs Européens, elle semble être asymétrique (Bacilieri et al. 1996) et pourrait faciliter la dispersion de *Q. petraea* dans les sites préalablement colonisés par *Q. robur*, ce qui compenserait les plus faibles capacités colonisatrices du premier (Petit et al. 2004). Les rétro-croisements successifs permettraient donc de conserver l'intégrité de l'espèce. Ce processus avait été auparavant suggéré chez l'*Eucalyptus* (Potts & Reid 1988) mais faisait déjà l'objet de controverse (Petit et al. 2004).

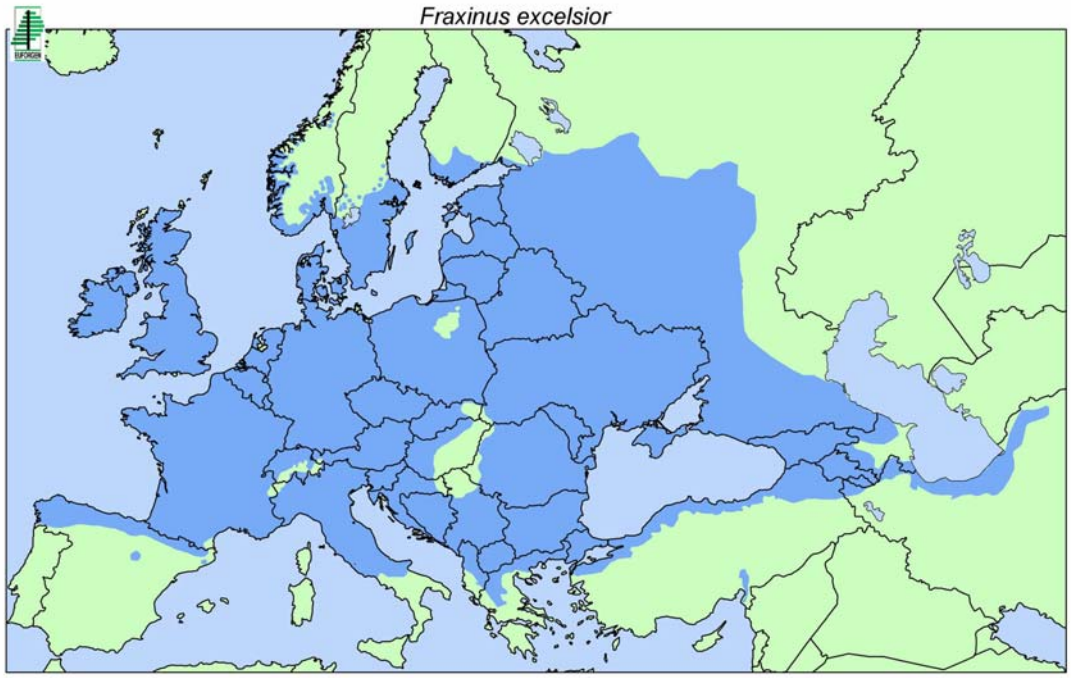
Cette asymétrie des flux de gènes existe dans d'autres complexes d'espèces : par exemple chez les peupliers Européens, où les flux de gènes semblent être plus importants vers l'espèce dont les conditions écologiques environnantes sont les plus opportunes (Lexer et al. 2005).

Les degrés d'introgression dans les zones de contact sont très différents selon les espèces d'arbres : elle est limtée ou inexistente chez certaines espèces de saules (Triest 2001), d'aulnes (Bousquet et al. 1990) et de pins (Epperson et al. 2001), suggérant dans la plupart des cas une forte sélection contre les hybrides au sein de clines étroits. Par contre, l'hybridation est très fréquente chez certaines espèces d'épicéas (Perron & Bousquet 1997; Bennuah et al. 2004), de peupliers (Keim et al. 1989), et d'*Aesculus* (DePamphilis & Wyatt 1990). Le degré d'hybridation est en général corrélé à des variations écologiques ou climatiques. Dans le cas d'*Aesculus*, les espèces parentales sont même absentes de certaines populations composées uniquement d'hybrides, ce qui peut suggérer une meilleure valeur adaptative des hybrides et/ou d'existence de très longues distances de dispersion pollinique.

IV. LES FRENES EUROPEENS

Deux espèces de frênes (*Fraxinus*, Oleaceae) autochtones sont répandues en France : le frêne commun (*F. excelsior* L.) et le frêne oxyphylle, ou « à feuilles étroites » (*F. angustifolia* Vahl). Les deux dernières ont des distributions géographiques très étendues à travers l'Europe, et relativement différentes : *F. angustifolia* est surtout concentré autour du bassin méditerranéen alors que la répartition de *F. excelsior* est plus nordique (Figure 3). La zone de contact est donc très étendue, allant de la France à la Turquie en passant par l'Autriche. En France, *F. excelsior* est présent un peu partout sauf en basse Provence et en Corse, et le long du littoral languedocien, où il est remplacé par *F. angustifolia* (Franc & Ruchaud 1996). En montagne, *F. excelsior* peut être présent jusqu'à 1400 mètres d'altitude. Les deux espèces sont en sympatrie principalement dans le sud de la France et le long de vallées fluviales comme le Rhône et la Loire (Picard 1983; Rameau et al. 1989). Dans ces régions, l'hybridation est soupçonnée depuis longtemps, en particulier par les gestionnaires forestiers.

Morphologiquement, ils diffèrent principalement par des caractères foliaires (9 à 15 folioles pour *F. excelsior* et 5 à 9 folioles pour *F. angustifolia*, celles du deuxième ayant une forme plus lancéolée que celles du premier), la couleur et la forme des bourgeons (noir pour *F. excelsior* et brun pour *F. angustifolia*), le port et la forme du tronc (Rameau et al. 1989; Figure 4). Par ailleurs, *F. angustifolia* opère pendant les premières années de croissance un



Fraxinus angustifolia



Figure 3. Distribution des deux espèces en Europe (Source : Euforgen 2003 pour *F. excelsior* et Fraxigen 2004 pour *F. angustifolia*).

changement de phyllotaxie d'opposé/décussé à tri-verticillé, ce qui augmente la branchaison et la fourchaison (Ramirez De Arellano Jimenez 2005).

La dispersion des graines et du pollen se fait par le vent. Ces essences sont post-pionnières héliophiles, interviennent donc en début de succession et peuvent être selon les milieux fortement colonisatrices (Franc & Ruchaud 1996). Leur longévité est de 150 à 200 ans. *Fraxinus excelsior* est classé comme feuillu précieux, et présente donc une grande valeur économique, alors que *F. angustifolia* n'est pas du tout exploité du fait de sa branchaison trop importante.

Le système de reproduction de *F. excelsior* est complexe et s'apparente à la trioécie : il existe des fleurs hermaphrodites, des fleurs mâles dont le pistil est rudimentaire ou avorté et des fleurs femelles dont les étamines sont rudimentaires ou avortées (Wallander 2001, Figure 5). Tous les intermédiaires existent entre ces trois états, et un individu ne possède jamais de fleurs mâles et femelles en même temps mais toutes les autres combinaisons sont possibles (Wallander 2001). Les fleurs hermaphrodites sont protogynes, bien que la déhiscence des anthères puisse se produire alors que le stigmate est encore réceptif. La floraison commence à partir de 15 ans, cela pouvant être variable selon les conditions environnementales (certains auteurs suggèrent 30 ans [Wardle 1961; Wallander 2001], mais cet âge semble un peu sur-estimé). En croisements contrôlés ou en populations naturelles, les mâles ont un succès reproducteur plus fort que les hermaphrodites, ce qui ne semble pas être le cas des femelles, ce qui pose la question du maintien de ce sexe dans les populations de *F. excelsior* (Morand-Prieur 2003; Morand-Prieur et al. 2003). Le système de reproduction de *F. angustifolia* est très mal connu, certains auteurs parlant de trioécie comme pour *F. excelsior* (Rameau et al. 1989; Wallander 2001). Il semblerait plutôt qu'il tende vers l'androdioécie (obs. pers., voir Chapitre 3). Si *F. excelsior* fleurit relativement tard dans la saison, à partir de mi-mars jusqu'au mois d'avril, *F. angustifolia* quant à lui fleurit très tôt, de la mi-décembre jusqu'à la fin janvier (Raquin et al. 2002; Jato et al. 2004).

La littérature est beaucoup plus riche sur *F. excelsior* que sur *F. angustifolia*. En ce qui concerne la recolonisation post-glaciaire, les données polliniques les plus anciennes (-10000 ans) identifient deux refuges pour *F. excelsior*, dans les Alpes du Sud et les Carpates (Huntley & Birks 1983). Une étude phylogéographique a suggéré l'existence de quatre refuges : dans la péninsule Ibérique, les Alpes du Sud-Est, l'Italie et les Balkans (Heuertz et al. 2004a). Les résultats obtenus sur différents types de marqueurs sont contradictoires : les marqueurs cytoplasmiques montrent une forte différenciation à travers l'Europe, ce qui pourrait suggérer

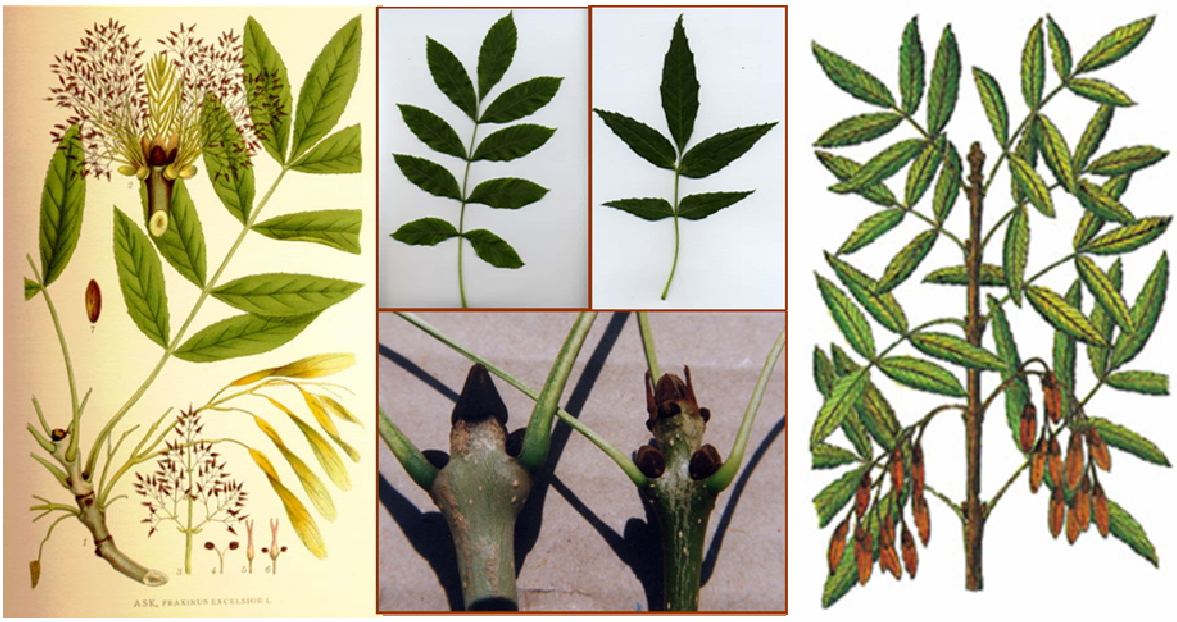


Figure 4. Planches botaniques et photos de *F. excelsior* et *F. angustifolia*. Source : planches, *http://www.tematico.princast.es* et *http://www.runeberg.org*; photos, Juan Fernandez.



Figure 5. Différents types de fleurs chez *F. excelsior* (gauche : fleur femelle, droite : haut = fleur hermaphrodite, bas = fleur mâle). Source : *http://www.systbot.gu.se* (photos Eva Wallander).

l'existence de flux de gènes restreints au cours de la recolonisation post-glaciaire (Heuertz et al. 2004a), alors que des marqueurs nucléaires montrent une très grande homogénéité génétique entre les populations du Nord et du Centre de l'Europe (Heuertz et al. 2004b). Etant données les longues distances de dispersion pollinique, il semble tout de même plus raisonnable de penser que les flux de gènes ont été très importants, au moins lorsque la topographie le permettait. Ceci dit, il semble que la France ait pu être recolonisée par au moins deux lignées voire trois provenant de refuges différents (Alpes, Italie et Espagne).

Malheureusement, aucune étude phylogéographique n'a été réalisée pour *F. angustifolia*, et les données polliniques ne permettent pas de différencier les deux types espèces. Cependant un pic pollinique est détectable à -6000 ans en Catalogne, ce qui pourrait correspondre à l'arrivée de *F. angustifolia* dans le Sud de la France (Huntley & Birks 1983). Il est donc difficile de savoir si les deux espèces ont recolonisé l'Europe par des voies différentes et/ou si elles étaient présentes dans les mêmes refuges pendant les dernières glaciations. Cependant, si les espèces ont divergé bien avant ces glaciations, il est possible que *F. angustifolia* soit remontée de refuges du Sud de l'Europe (Espagne, Italie) et *F. excelsior* principalement d'Europe Centrale (Alpes, Balkans) et qu'elles aient été à nouveau en contact en France.

Les distances de dispersion pollinique sont très importantes chez *F. excelsior*, comme attendu pour une espèce d'arbre forestier anémophile (Morand-Prieur 2003; Bacles et al. 2005), et sont très supérieures aux distances de dispersion des graines (Heuertz et al. 2003; Morand-Prieur 2003). Par conséquent, les populations sont en général très peu différenciées (Heuertz et al. 2001; Morand et al. 2002), même à l'échelle de l'Europe (Heuertz et al. 2004b). De façon plus surprenante, un fort déficit en hétérozygotes est toujours détecté au sein des populations (Heuertz et al. 2001; Morand et al. 2002), alors que *F. excelsior* est strictement allogame (Morand-Prieur 2003; Bacles et al. 2005; Raquin et al. résultats non publiés). L'hypothèse la plus vraisemblable reste l'existence de croisements préférentiels entre apparentés (*biparental inbreeding*), étant donnés la forte structure spatiale locale observée au sein d'une population française ainsi que les forts taux de dispersion à courte distance à l'intérieur de la parcelle (Morand-Prieur 2003). Cependant, l'effet d'éventuelles particularités des marqueurs microsatellites utilisés ne peut pas être complètement rejeté (allèles nuls par exemple, Bacles et al. 2005).

L'hybridation entre ces deux espèces de frênes est très mal connue, bien que suspectée depuis longtemps. Elle est possible en croisements contrôlés dans les deux sens *F. angustifolia* x *F. excelsior* et *F. excelsior* x *F. angustifolia* (Morand-Prieur et al. 2002; Raquin

et al. 2002). Aucune étude n'a été menée jusqu'ici en populations naturelles, ce qui fait le principal objet de cette thèse.

Cette thèse s'intéresse donc aux processus d'hybridation naturelle entre espèces forestières, en choisissant comme modèle biologique le complexe d'espèces des frênes européens *F. excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl. Nous nous sommes intéressés aux facteurs pouvant participer à la structuration et à la dynamique des zones hybrides de frênes, en intégrant plusieurs échelles d'étude. Nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur le rôle de l'habitat et de la floraison dans l'isolement reproducteur entre les deux espèces, et sur celui de la dispersion dans le maintien de leur cohésion. Afin d'avoir une idée de la *fitness* relative des hybrides et des espèces parentales, nous avons également estimé la variation du succès reproducteur au sein d'une zone hybride. En premier lieu, il s'agissait de développer des marqueurs discriminant les deux espèces afin de pouvoir aisément repérer les individus hybrides dans les populations. Les résultats de ces travaux ainsi qu'une discussion sur les difficultés rencontrées sont présentés dans le premier chapitre. Par la suite, nous nous sommes attachés à décrire la structure génétique et morphologique de deux zones hybrides à l'échelle de la France, et de détecter l'influence des conditions climatiques et de la géographie sur la structure observée (Chapitre 2). A une échelle locale, nous avons cherché à comprendre l'effet de la phénologie florale et de la dispersion sur la structuration et l'évolution d'une population de zone hybride. Nous avons d'abord mis en évidence l'influence de la variation de date de floraison sur la structure de la population d'étude. Puis nous avons mesuré l'importance relative de l'isolement temporel et de la dispersion, ainsi que l'influence de caractères phénotypiques et du système de reproduction sur la variabilité du succès reproducteur mâle, lequel est un premier indice de la valeur sélective relative des différentes classes d'individus. L'implication de ces résultats dans la compréhension de la dynamique et de l'évolution de cette zone hybride est donc discutée dans le chapitre 3. Enfin, la dernière partie de cette thèse porte sur l'étude de la dispersion des graines et de la variabilité du succès reproducteur femelle efficace, qui est un autre indice de la valeur sélective relative des différents groupes, et sur l'évaluation de l'évolution de la structure génétique de cette population sur quelques générations (Chapitre 4).

RÉFÉRENCES

Allendorf, F. W., R. F. Leary, P. Spruell & J. K. Wenburg. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. Trends Ecol. Evol. 16:613-622.

Anderson, E. & G. L. J. Stebbins. 1954. Hybridization as an evolutionary stimulus. Evolution 8:378-388.

Arnold, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York.

Arnold, M. L. & S. K. Emms. 1998. Paradigm lost. Natural hybridization and evolutionary innovations. Pp. 379-389 *in* D. J. Howard & S. H. Berlocher, eds. Endless forms: species and speciation. Oxford University Press, New York.

Bacilieri, R., A. Ducousso, R. J. Petit & A. Kremer. 1996. Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of european oaks. Evolution 50:900-908.

Bacles, C. F. E., J. Burczyk, A. J. Lowe & R. A. Ennos. 2005. Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. Evolution 59:979-990.

Barton, N. H. 2000. Estimating multilocus linkage disequilibria. Heredity 84:373-389.

Barton, N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. Mol. Ecol. 10:551-568.

Barton, N. H. & B. O. Bengtsson. 1986. The barrier to genetic exchange between hybridizing populations. Heredity 57:357-376.

Barton, N. H. & K. S. Gale. 1993. Genetic analysis of hybrid zones. Pp. 13-45 *in* R. G. Harrison, ed. Hybrid Zones and the Evolutionary Process. Oxford University Press, New York.

Barton, N. H. & G. M. Hewitt. 1985. Analysis of hybrid zones. Ann. Rev. Ecol. Syst. 16:113-148.

Barton, N. H. & G. M. Hewitt. 1989. Adaptation, speciation and hybrid zones. Nature 341:497-503.

Bennuah, S. Y., T. Wang & S. N. Aitken. 2004. Genetic analysis of the *Picea sitchensis* x *glauca* introgression zone in British Columbia. For. Ecol. Manage. 197:65-77.

Berry, R. J. & P. N. Scriven. 2005. The house mouse: a model and motor for evolutionary understanding. Biol. J. Linn. Soc. 84:335-347.

Bierne, N., P. Borsa, C. Daguin, D. Jollivet, F. Viard, F. Bonhomme & P. David. 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. Mol. Ecol. 12:447-461.

Bierne, N., P. David, P. Boudry & F. Bonhomme. 2002a. Assortative fertilization and selection at larval stage in the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. Evolution 56:292-298.

Bierne, N., P. David, A. Langlade & F. Bonhomme. 2002b. Can habitat specialisation maintain a mosaic hybrid zone in marine bivalves? Mar. Ecol. Prog. Ser. 245:157-170.

Bierne, N., T. Lenormand, F. Bonhomme & P. David. 2002c. Deleterious mutations in a hybrid zone: can mutational load decrease the barrier to gene flow? Genet. Res. 80:197-204.

Bleeker, W. & H. Hurka. 2001. Introgressive hybridization in *Rorippa* (Brassicaceae): gene flow and its consequences in natural and anthropogenic habitats. Mol. Ecol. 10

Blum, M. J. 2002. Rapid movement of a Heliconius hybrid zone: evidence for phase III of Wright's shifting balance theory? Evolution 56:1992-1998.

Bousquet, J., W. M. Cheliak, J. Wang & M. Lalonde. 1990. Genetic divergence and introgressive hybridization between *Alnus sinuata* and *A. crispa* (Betulaceae). Pl. Syst. Evol. 170:107-124.

Bradshaw, H. D. & D. W. Schemske. 2003. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. Nature 426:176-178.

Britch, S. C., M. L. Cain & D. J. Howard. 2001. Spatio-temporal dynamics of the *Allonemobius fasciatus-A. socius* mosaïc hybrid zone: a 14-year perspective. Mol. Ecol. 10:627-638.

Bronson, C. L., T. C. Grubb Jr, G. D. Sattler & M. J. Braun. 2003. Mate preference: a possible causal mechanism for a moving hybrid zone. Animal Behav. 65:489-500.

Buerkle, C. A., R. J. Morris, M. A. Asmussen & L. H. Rieseberg. 2000. The likelihood of homoploid hybrid speciation. Heredity 84:441-451.

Bullini, L. 1994. Origin and evolution of animal hybrid species. Trends Ecol. Evol. 9:422-426.

Burma, B. 1949. The species concept: a semantic review. Evolution 3:369-370.

Butlin, R. 1998. What do hybrid zones in general, and the Chorthippus parallelus zone in particular, tell us about speciation? Pp. 367-378 *in* D. J. Howard & S. H. Berlocher, eds. Endless forms: species and speciation. Oxford University Press, New York.

Cain, M. L., V. Andreasen & D. J. Howard. 1999. Reinforcing selection is effective under a relatively broad set of conditions in a mosaïc hybrid zone. Evolution 53:1343-1353.
Caisse, M. & J. Antonovics. 1978. Evolution in closely adjacent plant populations. IX. Evolution of reproductive isolation in clinal populations. Heredity 40:371-384.
Carney, S. E., S. A. Hodges & M. L. Arnold. 1996. Effects of differential pollen-tube growth on hybridization in the Louisiana irises. Evolution 50:1871-1878.
Chuine, I., J. Belmonte & A. Mignot. 2000. A modelling analysis of the genetic variation of phenology between tree populations. J. Ecol. 88:561-570.
Comps, B., D. Gömöry, J. Letouzey, B. Thiébaut & R. J. Petit. 2001. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. Genetics 157:389-397.
Costedoat, C., N. Pech, M.-D. Salducci, R. Chappaz & A. Gilles. 2005. Evolution of mosaïc hybrid zone between invasive and endemic species of Cyprinidae through space and time. Biol. J. Linn. Soc. 85:135-155.
Coyne, J. A. 1992. Genetics and speciation. Nature 355
Coyne, J. A. & H. A. Orr. 1997. "Patterns of speciation in *Drosophila*" revisited. Evolution 51:295-303.
Coyne, J. A. & H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. Curr. Ornithol. 1:159-187.
Craft, K. J., M. V. Ashley & W. D. Koenig. 2002. Limited hybridization between *Quercus lobata* and *Quercus douglasii* (Fagaceae) in a mixed stand in central coastal california. Am. J. Bot. 89:1792-1798.
Cronquist, A. 1978. Once again, what is a species? *in* J. A. Ramberger, ed. Biosystematics in Agriculture. Allanheld and Osmun, Monclair, NJ.
Dasmahapatra, K. K., M. J. Blum, A. Aiello, S. Hackwell, N. Davies, E. P. Bermingham & J. Mallet. 2002. Inferences from a rapidly moving hybrid zone. Evolution 56:741-753.
de Queiroz, K. 2005a. Different species problems and their resolution. Bioessays 27:1263-1269.
de Queiroz, K. 2005b. Ernst Mayr and the modern concept of species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:6600-6607.
Deleuze, G. & F. Guattari. 1991. Qu'est-ce que la philosophie? Les Editions de Minuit, Paris.
DePamphilis, C. W. & R. Wyatt. 1990. Electrophoretic confirmation of interspecific hybridization in *Aesculus* (Hippocastanaceae) and the genetic structure of a broad hybrid zone. Evolution 44:1295-1317.
Diaz, A. & M. R. Macnair. 1999. Pollen tube competition as a mechanism of prezygotic reproductive isolation between *Mimulus nasutus* and its presumed progenitor *M. guttatus*. New Phytol. 144:471-478.
Dobzhansky, T. 1937. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York.
Dodd, R. S. & Z. Afzal-Rafii. 2004. Selection and dispersal in a multispecies oak hybrid zone. Evolution 58:261-269.
Ellstrand, N. C. & K. A. Schierenbeck. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:7043-7050.
Emms, S. K. & M. L. Arnold. 1997. The effect of habitat on parental and hybrid fitness: transplant experiments with Louisiana irises. Evolution 51:1112-1119.
Endler, J. A. 1977. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton, NJ.
Epperson, B. K., F. W. Telewski, A. E. Plovanich-Jones & J. E. Grimes. 2001. Clinal differentiation and putative hybridization in a contact zone of *Pinus ponderosa* and *P. arizonica* (Pinaceae). Am. J. Bot. 88:1052-1057.
Facon, B., B. J. Genton, J. A. Shykoff, P. Jarne, A. Estoup & P. David. 2006. A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. Trends Ecol. Evol. in press
Facon, B., P. Jarne, J. P. Pointier & P. David. 2005. Hybridization and invasiveness in the freshwater snail *Melanoides tuberculata*: hybrid vigour is more important than increase in genetic variance. J. Evol. Biol. 18:524-535.
Felsenstein, J. 1981. Skepticism towards Santa Rosalia, or why are there so few kinds of animals. Evolution 35:124-138.

Fischer, J.-L. 1999. Hybride. Pp. 485-487 *in* D. Lecourt, ed. Dictionnaire d'Histoire et Philosophie des Sciences. PUF, Paris.
Fitter, A. H. & R. S. R. Fitter. 2002. Rapid changes in flowering time in British plants. Science 296:1689-1691.
Fox, G. A. 2003. Assortative mating and plant phenology: evolutionary and practical consequences. Evol. Ecol. Res. 5:1-18.
Franc, A. & F. Ruchaud. 1996. Le Frêne commun. Pp. 15-68. Autécologie des feuillus précieux : Frêne commun, Merisier, Erable sycomore, Erable plane. C.E.M.A.G.R.E.F. Editions, Riom, France.
Gavrilets, S. 1997. Hybrid zones with Dobzhansky-type epistatic selection. Evolution 51:1027-1035.
Ghiselin, M. T. 1974. A radical solution to the species problem. Syst. Zool. 23:536-544.
Good, T. P., J. C. Ellis, C. A. Annett & R. Pierotti. 2000. Bounded hybrid superiority in an avian hybrid zone: effects of mate, diet, and habitat choice. Evolution 54:1774-1783.
Gow, J. L., C. L. Peichel & E. B. Taylor. 2006. Contrasting hybridization rates between sympatric three-spined sticklebacks highlight the fragility of reproductive barriers between evolutionary young species. Mol. Ecol. in press
Grant, V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3-10.
Gregg, J. R. 1950. Taxonomy, language and reality. Am. Nat. 84:419-435.
Harrison, R. G. 1986. Pattern and process in a narrow hybrid zone. Heredity 56:337-349.
Harrison, R. G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. Oxford Surv. Evol. Biol. 7:69-128.
Harrison, R. G. 1998. Linking evolutionary pattern and process. The relevance of species concepts for the study of speciation. Pp. 19-31 *in* D. J. Howard & S. H. Berlocher, eds. Endless forms: species and speciation. Oxford University Press, New York.
Harrison, R. G. & J. Arnold. 1982. A narrow hybrid zone between closely related cricket species. Evolution 36:535-552.
Hendry, A. P. & T. Day. 2005. Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. Mol. Ecol. 14:901-916.
Hendry, A. P., Y. E. Morbey, O. K. Berg & J. K. Wenburg. 2004. Adaptive variation in senescence: reproductive lifespan in a wild salmon population. Proc. R. Soc. London B 271:259-266.
Heuertz, M., S. Fineschi, M. Anzidei, R. Pastorelli, D. Salvini, L. Paule, N. Frascaria-Lacoste, O. J. Hardy, X. Vekemans & G. G. Vendramin. 2004a. Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. Mol. Ecol. 13:3437-3452.
Heuertz, M., J. F. Hausman, O. J. Hardy, G. G. Vendramin, N. Frascaria-Lacoste & X. Vekemans. 2004b. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern european populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Evolution 58:976-988.
Heuertz, M., J. F. Hausman, I. Tsvetkov, N. Frascaria-Lacoste & X. Vekemans. 2001. Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Mol. Ecol. 10:1615-1623.
Heuertz, M., X. Vekemans, J. F. Hausman, M. Palada & O. J. Hardy. 2003. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. Mol. Ecol. 12:2483-2495.
Hewitt, G. M. 1988. Hybrid zones-Natural laboratories for evolutionary studies. Trends Ecol. Evol. 3:158-187.
Hewitt, G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. Biol. J. Linn. Soc. 68:87-112.
Hewitt, G. M. 2000. The genetic legacy of the quaternary ice ages. Nature 405:907-913.
Hewitt, G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography-or seeing genes in space and time. Mol. Ecol. 10:537-549.
Hewitt, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 359:183-195.
Hey, J. 2001a. Genes, categories, and species. The evolutionary and cognitive causes of the species problem. Oxford University Press, New York.
Hey, J. 2001b. The mind of the species problem. Trends Ecol. Evol. 16:326-329.

Hey, J., R. S. Waples, M. L. Arnold, R. K. Butlin & R. G. Harrison. 2003. Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. Trends Ecol. Evol. 18:597-603.
Howard, D. J. 1986. A zone of overlap and hybridization between two ground cricket species. Evolution 40:34-43.
Howard, D. J. 1993. Reinforcement: origin, dynamics, and fate of an evolutionary hypothesis. Pp. 46-69 *in* R. G. Harrison, ed. Hybrid Zones and the Evolutionary Process. Oxford University Press, New York.
Howard, D. J. 1999. Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. Ann. Rev. Ecol. Syst. 30:109-132.
Howard, D. J., S. C. Britch, W. E. Braswell & J. L. Marshall. 2003. Evolution in hybrid zones. Pp. 297-314 *in* R. K. Singh & M. K. Uyenoyama, eds. The Evolution of Population Biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
Howard, D. J., P. G. Gregory, J. M. Chu & M. L. Cain. 1998. Conspecific sperm precedence is an effective barrier to hybridization between closely related species. Evolution 52:511-516.
Howard, D. J., R. W. Preszler, J. Williams, S. Fenchel & W. J. Boecklen. 1997. How discrete are oak species? Insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Quercus gambelii*. Evolution 51:747-755.
Howard, D. J. & G. L. Waring. 1991. Topographic diversity, zone width, and the strength of reproductive isolation in a zone of overlap and hybridization. Evolution 45:1120-1135.
Hull, D. L. 2002. Recent philosophy of biology: a review. Acta Biotheor. 50:117-128.
Huntley, B. & H. J. B. Birks. 1983. An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe: 0-13 000 Years Ago. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
Jato, V., F. J. Rodriguez-Rajo, N. Dacosta & M. J. Aira. 2004. Heat and chill requirements of *Fraxinus* flowering in Galicia (NW Spain). Grana 43:217-223.
Keim, P., K. N. Paige, T. G. Whitham & K. G. Lark. 1989. Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: occurrence of unidirectional gene flow. Genetics 123:557-565.
Key, K. H. L. 1968. The concept of stasipatric speciation. Syst. Zool. 17:14-22.
Kirkpatrick, M. & V. Ravigné. 2002. Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. Am. Nat. 159:S22-S35.
Kirkpatrick, M. & M. R. Servedio. 1999. The reinforcement of mating preferences on an island. Genetics 151:865-884.
Kremer, A., J. L. Dupouey, J. D. Deans, J. E. Cottrell, U. Csaikl, R. Finkeldey, S. Espinel, J. Jensen, J. Kleinschmit, B. Van Dam, A. Ducousso, I. Forrest, U. Lopez de Heredia, A. J. Lowe, M. Tutkova, R. C. Munro, S. Steinhoff & V. Badeau. 2002. Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. Ann. For. Sci. 59:777-787.
Kruuk, L. E. B., S. J. E. Baird, K. S. Gale & N. H. Barton. 1999. A comparison of multilocus clines maintained by environmental adaptation or by selection against hybrids. Genetics 153:1959-1971.
Lamont, B. B., T. He, N. J. Enright, S. L. Krauss & B. P. Miller. 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. J. Evol. Biol. 16:551-557.
Lande, R. 1981. Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3721-3725.
Lascoux, M., A. E. Palmé, R. Cheddadi & R. G. Latta. 2004. Impact of Ice Ages on the genetic structure of trees and shrubs. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 359:197-207.
Levin, D. A. 2002. The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution. Oxford University Press, Oxford, UK.
Levin, D. A., J. Francisco-Ortega & R. K. Jansen. 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. Cons. Biol. 10:10-16.
Lexer, C., M. F. Fay, J. A. Joseph, M.-S. Nica & B. Heinze. 2005. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. Mol. Ecol. 14:1045-1057.
Lherminier, P. & M. Solignac. 2005. De l'espèce. Syllepse, Paris.
Liou, L. W. & T. D. Price. 1994. Speciation by reinforcement of prezygotic isolation. Evolution 48:1451-1459.

Macnair, M. R. & M. Gardner. 1998. The evolution of edaphic endemics. Pp. 157-171 *in* D. J. Howard & S. H. Berlocher, eds. Endless forms: species and speciation. Oxford University Press, New York.

Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. Pp. 381-424 *in* M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson, eds. Species: the unit of biodiversity. Chapman & Hall, London.

Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York.

Mayr, E. 1963. Animal species and speciation. Belknap Press, Cambridge, USA.

Mayr, E. 2001. Wu's genic view of speciation. J. Evol. Biol. 14:866-867.

McCarthy, E. M., M. A. Asmussen & W. W. Anderson. 1995. A theoretical assessment of recombinational speciation. Heredity 74:502-509.

McDonnell, L. J., D. F. Gartside & M. J. Littlejohn. 1978. Analysis of a narrow hybrid zone between two species of *Pseudophryne* (Anura: Leptodactylidae) in South-Eastern Australia. Evolution 32:602-612.

McNeilly, T. & J. Antonovics. 1968. Evolution in closely adjacent plant populations. IV. Barriers to gene flow. Heredity 23:205-218.

Miglia, K. J., E. Durant McArthur, W. S. Moore, H. Wang, J. H. Graham & D. C. Freeman. 2005. Nine-year reciprocal transplant experiment in the gardens of the basin and mountain big sagebrush (*Artemisia tridentata*: Asteraceae) hybrid zone of Salt Creek Canyon: the importance of multiple-year tracking of fitness. Biol. J. Linn. Soc. 86:213-225.

Moore, W. 1977. An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. Q. Rev. Biol. 52:263-277.

Morand-Prieur, M.-E. 2003. Evolution et maintien d'un système de reproduction polymorphe. Approche génétique et écologique de la polygamie chez le frêne commun, *Fraxinus excelsior* L. PhD Thesis. ENGREF Paris. 95 p.

Morand-Prieur, M.-E., C. Raquin, J. A. Shykoff & N. Frascaria-Lacoste. 2003. Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). Am. J. Bot. 90:949-953.

Morand-Prieur, M.-E., F. Vedel, C. Raquin, S. Brachet, D. Sihachakr & N. Frascaria-Lacoste. 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. Mol. Ecol. 11:613-617.

Morand, M.-E., S. Brachet, P. Rossignol, J. Dufour & N. Frascaria-Lacoste. 2002. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. Mol. Ecol. 11:377-385.

Mosseler, A. & C. S. Papadopol. 1989. Seasonal isolation as a reproductive barrier among sympatric *Salix* species. Can. J. Bot. 67:2563-2570.

Muir, G., C. C. Fleming & C. Schlötterer. 2000. Species status of hybridizing oaks. Nature 405:1016.

Muir, G. & C. Schlötterer. 2004. Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). Mol. Ecol. 14:549-561.

Neuffer, B., A. Auge, H. Mesch, U. Amarell & R. Brandl. 1999. Spread of violets in polluted forest: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. Mol. Ecol. 8:365-377.

Nosil, P., T. H. Vines & D. J. Funk. 2005. Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. Evolution 59:705-719.

Nürnberger, B. D., N. H. Barton, L. E. B. Kruuk & T. H. Vines. 2005. Mating patterns in a hybrid zone of fire-bellied toads (*Bombina*): inferences from adult and full-sib genotypes. Heredity 94:247-257.

Orr, H. A. 1996. Dobzhansky, Bateson, and the genetics of speciation. Genetics 144:1331-1335.

Orr, H. A. 2001. Some doubts about (yet another) view of species. J. Evol. Biol. 14:870-871.

Orr, H. A. & D. C. Presgraves. 2000. Speciation by post-zygotic isolation: forces, genes and molecules. Bioessays 22:1085-1094.

Otto, S. P. & J. Whitton. 2000. Polyploid incidence and evolution. Ann. Rev. Genet. 34:401-437.

Perron, M. & J. Bousquet. 1997. Natural hybridization between black spruce and red spruce. Mol. Ecol. 6:725-734.

Perry, W. L., J. L. Feder & D. M. Lodge. 2001. Implications of hybridization between introduced and resident *Orconectes* crayfishes. Cons. Biol. 15:1656-1666.
Petit, C., P. Lesbros, X. Ge & J. D. Thompson. 1997. Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). Heredity 79:31-40.
Petit, R. J., I. Aguinagalde, J.-L. de Beaulieu, C. Bittkau, S. Brewer, R. Cheddadi, R. Ennos, S. Fineschi, D. Grivet, M. Lascoux, A. Mohanty, G. Müller-Starck, B. Demesure-Musch, A. Palmé, J. P. Martin, S. Rendell & G. G. Vendramin. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. Science 300:1363-1365.
Petit, R. J., C. Bodénès, A. Ducousso, G. Roussel & A. Kremer. 2004. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. New Phytol. 161:151-164.
Picard, J.-F. 1983. A propos du frêne oxyphylle, *Fraxinus angustifolia* Vahl. Forêt-Entreprise 83:2-4.
Pigliucci, M. 2003a. Selection in a model system: ecological genetics of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. Ecology 84:1700-1712.
Pigliucci, M. 2003b. Species as family resemblance concepts: the (dis-)solution of the species problem? Bioessays 25:596-602.
Potts, B. M. & J. B. Reid. 1988. Hybridization as a dispersal mechanism. Evolution 42:1245-1255.
Rameau, J. C., D. Mansion & G. Dumé. 1989. Flore forestière française, guide écologique illustré. Tome 1. Plaines et collines. Institut pour le Développement Forestier, Paris.
Ramirez De Arellano Jimenez, F. 2005. Variabilité morphologique, anatomique et architecturale du frêne oxyphylle (*Fraxinus angustifolia* Vahl. ssp *angustifolia*). PhD Thesis. Université Montpellier II.
Ramsey, J. & D. W. Schemske. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 29:467-501.
Ramsey, J. & D. W. Schemske. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 33:589-639.
Rand, D. M. & R. G. Harrison. 1989. Ecological genetics of a mosaïc hybride zone: mitochondrial, nuclear and reproductive differentiation of crickets by soil type. Evolution 43:432-449.
Raquin, C., S. Brachet, S. Jeandroz, F. Vedel & N. Frascaria-Lacoste. 2002. Combined analyses of microsatellite and RAPD markers demonstrate possible hybridisation between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. For. Genet. 9:103-111.
Rathcke, B. & E. P. Lacey. 1985. Phenological patterns of terrestrial plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 16:179-214.
Remington, C. L. 1968. Suture zones of hybrid interaction between recently joined biotas. Evol. Biol. 2:321-328.
Reydon, T. A. C. 2004. Why does the species problem persist? Bioessays 26:300-305.
Reydon, T. A. C. 2005. On the nature of the species problem and the four meanings of 'species'. Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed. Sci. 36:135-158.
Rhymer, J. M. & D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. Ann. Rev. Ecol. Syst. 27:83-109.
Rice, W. R. & G. W. Salt. 1990. The evolution of reproductive isolation as a correlated character under sympatric conditions. Evolution 44:1140-1152.
Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. Ann. Rev. Ecol. Syst. 28:359-389.
Rieseberg, L. H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. Trends Ecol. Evol. 16:351-358.
Rieseberg, L. H., M. A. Archer & R. K. Wayne. 1999a. Transgressive segregation, adaptation and speciation. Heredity 83:363-372.
Rieseberg, L. H. & S. E. Carney. 1998. Plant hybridization. Tansley review No. 102. New Phytol. 140:599-624.
Rieseberg, L. H., A. M. Desrochers & S. J. Youn. 1995. Interspecific pollen competition as a reproductive barrier between sympatric species of Helianthus. Am. J. Bot. 82:515-519.
Rieseberg, L. H. & N. C. Ellstrand. 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? Crit. Rev. Plant Sci. 12:213-241.
Rieseberg, L. H., O. Raymond, D. M. Rosenthal, Z. Lai, K. Livingstone, T. Nakazato, J. L. Durphy, A. E. Schwarzbach, L. A. Donovan & C. Lexer. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. Science

Rieseberg, L. H., B. Sinervo, C. R. Linder, M. C. Ungerer & D. M. Arias. 1996. Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids. Science 272:741-745.
Rieseberg, L. H., J. Whitton & K. Gardner. 1999b. Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. Genetics 152:713-727.
Rundle, H. D., F. Breden, C. Griswold, A. O. Mooers, R. A. Vos & J. Whitton. 2001. Hybridization without guilt: gene flow and the biological species concept. J. Evol. Biol. 14:868-869.
Rundle, H. D. & P. Nosil. 2005. Ecological speciation. Ecol. Letters 8:336-352.
Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. Trends Ecol. Evol. 19:198-207.
Servedio, M. R. 2001. Beyond reinforcement: the evolution of premating isolation by direct selection on preferences and postmating, prezygotic incompatibilities. Evolution 55:1909-1920.
Servedio, M. R. & M. A. F. Noor. 2003. The role of reinforcement in speciation: theory and data. Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 34:339-364.
Silvertown, J., C. Servaes, P. Biss & D. Macleod. 2005. Reinforcement of reproductive isolation between adjacent populations in the Park Grass Experiment. Heredity 95:198-205.
Slatkin, M. 1973. Gene flow and selection in a cline. Genetics 75:733-756.
Slatkin, M. 1982. Pleiotropy and parapatric speciation. Evolution 36:263-270.
Sneath, P. H. A. 1976. Phenetic taxonomy at the species level and above. Taxon 25:437-450.
Song, B. H., X. Q. Wang, X.-R. Wang, K.-Y. Ding & D. Y. Hong. 2003. Cytoplasmic composition in *Pinus densata* and population establishment of the diploid hybrid pine. Mol. Ecol. 12:2995-3001.
Song, B. H., X. Q. Wang, X.-R. Wang, L. J. Sun, D. Y. Hong & P. H. Peng. 2002. Maternal lineages of *Pinus densata*, a diploid hybrid. Mol. Ecol. 11:1057-1063.
Stam, P. 1983. The evolution of reproductive isolation in closely adjacent plant populations through differential flowering time. Heredity 50:105-118.
Streiff, R., A. Ducousso, C. Lexer, H. Steinkellner, J. Gloessl & A. Kremer. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. Mol. Ecol. 8:831-841.
Sun, L. J., C. T. Ting & C. I. Wu. 2004. The normal function of a speciation gene, *Odysseus*, and its hybrid sterility effect. Science 305:81-83.
Swenson, N. G. 2006. Gis-based niche models reveal unifying climatic mechanisms that maintain the location of avian hybrid zones in a North American suture zone. J. Evol. Biol. in press
Swenson, N. G. & D. J. Howard. 2004. Do suture zones exist? Evolution 58:2391-2397.
Swenson, N. G. & D. J. Howard. 2005. Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. Am. Nat. 166:581-591.
Szymura, J. M. & N. H. Barton. 1986. Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in Southern Poland. Evolution 40:1141-1159.
Szymura, J. M. & N. H. Barton. 1991. The genetic structure of a hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparisons between loci and between transects. Evolution 45:237-261.
Taberlet, P., L. Fumagalli, A.-G. Wust-Saucy & J.-F. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Mol. Ecol. 7:453-464.
Taylor, E. B., J. W. Boughman, M. Groenenboom, M. Sniatynski, D. Schluter & J. L. Gow. 2005. Speciation in reverse: morphological and genetic evidence of the collapse of a three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) species pair. Mol. Ecol. 15:343-355.
Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. Pp. 3-27 *in* D. Otte & J. A. Endler, eds. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
Thoday, J. M. & J. B. Gibson. 1962. Isolation by disruptive selection. Nature 193:1164-1166.
Tovar-Sanchez, E. & K. Oyama. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between Quercus crassifolia and Quercus crassipes (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. Am. J. Bot. 91:1352-1363.
Triest, L. 2001. Hybridization in staminate and pistillate *Salix alba* and *S. fragilis* (Salicaceae): morphology versus RAPDs. Pl. Syst. Evol. 226:143-154.
Ungerer, M. C., S. J. E. Baird, J. Pan & L. H. Rieseberg. 1998. Rapid hybrid speciation in wild sunflowers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11757-11762.

Valbuena-Carabaña, M., S. C. González-Martínez, V. L. Sork, C. Collada, A. Soto, P. G. Goicoechea & L. Gil. 2005. Gene flow and hybridization in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl.) in central Spain. Heredity 95:457-465.

Vines, T. H., S. C. Köhler, M. Thiel, I. Ghira, T. R. Sands, C. J. MacCallum, N. H. Barton & B. Nürnberger. 2003. The maintenance of reproductive isolation in a mosaic hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*. Evolution 57:1876-1888.

Wallander, E. 2001. Evolution of wind-pollination in *Fraxinus* (Oleaceae) - an ecophylogenetic approach. PhD Thesis. Göteborg University.

Wang, X.-R., A. E. Szmidt & O. Savolainen. 2001. Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. Genetics 159:337-346.

Wardle, P. 1961. Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L. J. Ecol. 49:739-751.

Weis, A. E. 2005. Direct and indirect assortative mating: a multivariate approach to plant flowering schedules. J. Evol. Biol. 18:536-546.

Weis, A. E. & T. M. Kossler. 2004. Genetic variation in flowering time induces phenological assortative mating: quantitative genetic methods applied to *Brassica rapa*. Am. J. Bot. 91:825-836.

Weis, A. E., J. Winterer, C. Vacher, T. M. Kossler, C. A. Young & G. L. Le Buhn. 2005. Phenological assortative mating in flowering plants: the nature and consequences of its frequency-dependence. Evol. Ecol. Res. 7:161-181.

Whittemore, A. T. & B. A. Schaal. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2540-2544.

Widmer, A. & C. Lexer. 2001. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. Trends Ecol. Evol. 16:267-269.

Williams, J. H., W. J. Boecklen & D. J. Howard. 2001. Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridization. Heredity 87:680-690.

Wittgenstein, L. 1953. Philosophical investigations. Basil Blackwell, Oxford, UK.

Wright, S. 1932. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution. Proc. Sixth Int. Cong. Genet., Hague 1:356-366.

LE FRÊNE

Près des vieilles maisons, au levant, il y avait toujours un frêne. L'un d'entre eux a même survécu à la Grande Guerre et il étale encore ses branches sur les toits et les prés d'alentour ; les grives litornes et les vendangettes qui se nourrissent de ses fruits ont distribué ses graines dans le bois où elles vont se poser la nuit et, parmi les sapins et les hêtres, les jeunes frênes sont en train de redonner au bois l'aspect qu'il a certainement dû avoir en des temps très lointains.

Quand il revint dans sa vieille maison pour la reconstruire, mon grand-père voulut lui aussi planter un frêne dans son jardin à la place de celui qui avait été tué par les obus. Mais il n'était pas très grand et les deux peupliers qui s'élevaient aux coins du potager le dépassèrent bien vite. Moi, j'étais impatient de le voir grandir et chaque année je mesurais son tronc parce que je voulais en tirer des planches pour faire des skis. Quand je suis revenu de la guerre je n'ai plus retrouvé ce frêne et aujourd'hui, là où ma mère allait cueillir des dahlias, il y a un parking. Est-ce pour toutes ces raisons que j'ai voulu, moi aussi, planter au nord de mon jardin un jeune frêne que j'ai élevé du bois ? Il est grand et droit, flexible au vent et à la neige, mais il commence maintenant seulement à allonger les branches qui étaient sorties des petits bourgeons noirs.

Moi, je ne le verrai pas étendre ses branches vers le toit, et maintenant qu'on fabrique les skis avec des résines synthétiques et de la fibre de carbone, mes petits-enfants n'auront pas besoin de rêver aux planches de son tronc. Grandira-t-il ? Grandira-t-il au point de devenir comme les vieux frênes séculaires proches de nos pauvres vieilles maisons ?

Je me le demande parce que la vie des arbres est devenue de plus en plus difficile maintenant que les hommes se montrent insensibles au monde végétal. Mais cette habitude d'avoir un frêne près de sa maison vient peut-être de la très lointaine époque où l'on croyait que les humains étaient descendus de cet arbre.

Le genre *Fraxinus* appartient à la famille des Oléacées ; de ce genre on connaît près de soixante-dix espèces qui se trouvent exclusivement dans l'hémisphère Nord. Ils poussent de la Méditerranée à la Norvège et, sur nos montagnes, nous les rencontrons jusqu'à plus de mille cinq cent mètres d'altitude. Ils peuvent atteindre de trente à quarante mètres de hauteur et de trois à quatre mètres de diamètre. Mais il en existe de plus majestueux, vieux de plusieurs siècles, surtout dans les pays situés au nord des Alpes.

Le tronc est élancé, assez peu ramifié ; chez les arbres adultes isolés la couronne est ample et dense. Lorsqu'il est jeune, son écorce est lisse, de couleur olivâtre, mais au fil des ans elle devient grise, rugueuse et fissurée. (Avec l'âge, comme les humains ressemblent aux arbres !) Les feuilles sont caduques, composées au minimum de neuf folioles sessiles, lancéolées, aux bords légèrement dentés, de couleur vert sombre et glabres sur la partie supérieure, plus pâles sur la partie inférieure. Les bourgeons sont veloutés et foncés, presque du noir des fusains. Les fleurs se développent avant les feuilles, elles tendent au violet et sont réunis en grappes. Les fruits, qui contiennent les graines déjà prêtes à germer, sont formés par des samares longues de deux à quatre centimètres, munies d'une aile apicale ; en hiver ou au printemps, elles sont disséminées par le vent et par les oiseaux.

Le bois de frêne est blanc rosé avec des reflets nacrés ; on l'utilise pour fabriquer le manche des instruments de travail ou de sport, et des meubles, des charrettes et des récipients. Des gros troncs droits on tirait du bon bois de construction et des parties veinées une précieuse « ébène grise ». Les feuilles de frêne constituent également un bon fourrage, aussi vert que sec ; mises à infuser dans l'eau bouillante, elles soignent les rhumatismes et sont diurétiques ; l'écorce était utilisée pour tanner des peaux, mais aussi pour faire tomber la fièvre car, comme celle du saule, elle contient de la salicine.

L'espère *Fraxinus ornus*, le frêne à fleurs, produit une bonne quantité de « manne » : un exsudat jaunâtre qui suinte des blessures du tronc, et qui, au contact de l'air, devient blanc et se coagule. Cette manne a un goût délicat et sucré et, comme elle se dissout bien dans l'eau, elle constitue une boisson rafraîchissante légèrement laxative.

Jadis, on en faisait grand usage : à Venise, on en consommait des milliers de livres, venant du sud de l'Italie, ce qui représentait une dépense annuelle de vingt mille ducats. Le Sénat pensa alors qu'on pouvait recueillir la manne des bois situés à l'intérieur des frontières de la République et, sur les conseils d'un moine, Francesco da Cosenza, en 1769, il décréta « intangibles », même pour les propriétaires privés tous les frênes à fleurs de Dalmatie, et ordonna que les récoles soient mises en adjudication, en fixant d'avance les prix. Mais l'affaire ne donna pas de bons résultats et en 1790, après un autre décret, chacun recommença à extraire en toute liberté la manne des bois, même communaux, et à la vendre au plus offrant (Adolfo di Bérenger, *Arecheologia forestale*).

Les meilleurs frênes producteurs de manne poussent dans la province de Palerme parce qu'ils y trouvent les conditions optimales quant au climat, aux précipitations et à la fertilité du sol ; ils bénéficient en outre d'une période végétative longue, lumineuse et relativement sèche. Pendant l'été, grâce à une technique particulière permettant de ne pas trop léser l'arbre, on pratique chaque jour sur le tronc des incisions horizontales par où la lymphe descend et se coagule rapidement en manne, bonne à récolter. Mais si par hasard il pleut ce jour-là le produit fond !

Pour les Grecs, le frêne était lui aussi un « arbre heureux » ; ils l'avaient consacré à Némésis et aux nymphes Melie, nées du sang d'Uranus. Mais dans des mythes plus anciens on faisait descendre du frêne, dont ils tombèrent comme des fruits mûrs, les hommes de la troisième lignée, porteurs d'armes de bronze, insolents et sans pitié, qui vouaient un culte au frêne. Hésiode écrit dans les *Travaux et les jours : «* Zeus le père créa une troisième lignée de mortels / en bronze, en rien semblable à celle en argent, / nés de frênes puissants et terribles : ceux d'Arès / aimaient les actes cruels et violents, et de pain / point ne mangeaient, mais leur cœur intrépide était adamantin… »

Mais c'est dans un pays beaucoup plus lointain, là-haut, dans le nord de l'Europe où les dieux tiennent conseil chaque jour, qu'il existe un frêne bien particulier, unique : *Yggdrasill* » l'arbre du destin. Il s'élève dans le ciel pour soutenir l'univers et ses branches s'étendent sur toute la terre. Il est ancré au sol par trois racines ; l'une aboutit dans le monde de la mort, *Hel*, l'autre dans le monde des Géants du glacier, *Mimir*, la troisième dans la terre des *Asi*. A côté du « premier des arbres » coule la fontaine de *Urdhr* où les Nornes gouvernent le destin des hommes et aspergent d'eau et de boue blanche le frêne *Yggdrasi*ll pour qu'il ne se dessèche pas : « c'est de là que vient la rosée qui tombe dans la vallée.»

La sibylle de la Völuspà évoquait cet arbre avant même qu'il n'existât, avant qu'il ne s'élevât au dessus du sol, et lorsqu'il apparut dans toute sa splendeur il amorçait déjà sa dégénérescence parce que les cerfs mangeaient ses feuilles et un serpent ses racines. Dans *L'Edda*, Snorri Sturluson chante : « Le frêne Yggdrasill / subit plus de peines / qu'on ne peut l'imaginer, en haut le cerf le mord, / sur les côtés il pourrit / en bas Nidhhöggr le déchiquette. »

Avec ses éléments mythiques, ce frêne géant, socle et colonne de l'univers, devient le symbole de tous les dangers mortels nés du développement technologique incontrôlable qui ronge les racines mêmes de la vie et en trouble les sources.

MARIO RIGONI-STERN, *Arbres en liberté* (1991)

CHAPITRE PREMIER

RECONNAISSANCE D'ESPECES

Afin de détecter aisément les hybrides en populations naturelles, et par la même occasion répondre à une demande sociale très forte, le premier objectif de cette thèse consistait en l'obtention de marqueurs discriminants efficaces pour la reconnaissance des espèces. En effet, des lots de graines de *F. excelsior* d'origine française livrés en Irlande ont engendré des litiges commerciaux à la fin des années 90 : la « pureté » spécifique de ces lots semblait suspecte. Certains de ces lots provenaient d'une région de sympatrie avec *F. angustifolia*, la vallée de Saône, dans laquelle certains peuplements ont été recommandés en tant que provenance certifiée de *F. excelsior*, bien que l'hybridation ait été suspectée depuis quelques années dans cette région. La première tentative de mise au point de tels marqueurs avait été entreprise par Jeandroz et al. 1996) avec des marqueurs RAPD, mais peu de ces marqueurs se sont avérés réellement efficaces par la suite (Raquin et al. 2002a). Un marqueur microsatellite cytoplasmique, discriminant les espèces sur quelques échantillons par une paire de bases, a été mis au point par la suite et sa transmission maternelle fut vérifiée sur les croisements contrôlés (Morand-Prieur et al. 2002). Malheureusement, ce marqueur s'est révélé inefficace en zone hybride (voir Chapitre 2). Les marqueurs RAPD étant réputés pour être très peu reproductibles, une solution pour obtenir des marqueurs stables était le développement de SCARs. Par ailleurs, afin d'obtenir quelques informations complémentaires sur la biologie des espèces, en particulier des caractères germinatifs, des marqueurs physiologiques et morphologiques pouvaient s'avérer également très utiles. Certaines études semblaient révéler d'importantes différences de dormance entre les deux espèces (par exemple Raquin et al. 2002b). Ce chapitre présente donc la mise au point de ces marqueurs, le test de leur efficacité en populations naturelles, et une brève discussion sur les éventuelles implications des différences germinatives entre *F. excelsior* et *F. angustifolia*. Il a fait l'objet de la publication d'un article, sous presse dans *Annals of Forest Science*.

New insights in the recognition of the European ash species *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl as useful tools for forest management

Pierre R. Gérard[a,*], Juan F. Fernández-Manjarrés[a], Paola Bertolino[a], Jean Dufour[b], Christian Raquin[a,†] and Nathalie Frascaria-Lacoste[a,†]

[a]Ecologie, Systématique, Evolution, UMR CNRS-ENGREF 8079, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex, France

[b]INRA, Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, BP 20169 Ardon, 45160 Olivet, France

Abstract - Common ash (*Fraxinus excelsior* L.) and narrow-leaved ash (*F. angustifolia* Vahl) are the most common ash species in Western Europe. The former is considered to be a highly valuable timber tree and contamination of its seed lots by the latter is strongly undesirable. We studied molecular, physiological and morphological characteristics that can help to detect the presence of *F. angustifolia* at the population level, either in seed and/or seedling samples, or in adult ash leave samples from natural or managed populations. First we developed two molecular markers, which correspond to a RAPD-SCAR marker and a nuclear microsatellite-derived marker. Results indicate that these markers are almost specific to one or the other species for a set of populations sampled across Europe. Second, first year dormancy was studied using germination tests without stratification. *F. excelsior* seeds did not germinate at all, while germinations were observed in samples of *F. angustifolia* and introgressed populations after 16 weeks. In addition, *F. angustifolia* embryo/seed length ratios at the dispersal stage were significantly higher than those from *F. excelsior* populations. This study provides straightforward and robust tools for avoiding commercial problems of impurity of seed lots and can help forest managers to certify common ash stands.

ashes / RAPD-SCAR / dormancy / discriminant markers / hybridization

Résumé – De nouveaux outils pour la reconnaissance des frênes européens *Fraxinus excelsior* L. et *F. angustifolia* Vahl. : une aide au diagnostic. Le frêne commun (*Fraxinus excelsior* L.) et le frêne oxyphylle (*F. angustifolia* Vahl) sont les deux espèces de frêne les plus répandues en Europe occidentale. Le frêne commun étant le seul à posséder une importante valeur commerciale, la contamination de lots de graines par du frêne oxyphylle est fortement indésirable. Nous avons étudié des caractéristiques moléculaires, morphologiques et physiologiques qui pourront se révéler très utiles à la détection de la présence de *F. angustifolia* à l'échelle populationnelle, dans des lots de graines ou de semis, ainsi que dans des échantillons de feuilles d'arbres adultes issus de populations naturelles ou exploitées. Nous avons développé deux marqueurs moléculaires, un SCAR-RAPD et un marqueur issu d'un locus microsatellite nucléaire. Testés sur un ensemble de populations européennes, ces marqueurs se sont révélés quasi-spécifiques de l'une ou l'autre des deux espèces. D'autre part, nous avons étudié la dormance des graines en première année par des tests de germination sans stratification. Aucune germination n'a été observée sur un ensemble de descendances de frêne commun, alors que des germinations ont été observées sur toutes les descendances de frêne oxyphylle après seize semaines, ainsi que sur certaines descendances issues de populations introgressées. Enfin, nous avons montré que les embryons de *F. excelsior* à maturité dispersive occupent significativement moins de place dans la graine que ceux de *F. angustifolia*. Cette étude permet de fournir des outils rapides et efficaces qui pourront permettre d'éviter d'éventuels problèmes commerciaux liés à la pureté de lots de graines, et d'aider à la certification des peuplements de frêne.

frênes / SCAR-RAPD / dormance / marqueurs discriminants / hybridation

1. INTRODUCTION

The identification of closely-related species can require multiple lines of evidence, particularly if gene flow still occurs. A single type of trait, either morphological or genetic, can be insufficient for efficient separation of groups, as it is the case for the common ash (*Fraxinus excelsior* L.) and the narrow-leaved ash (*F. angustifolia* Vahl) in Western Europe. The former is sought-after because of its tough and elastic wood and its rapid growth. The latter, with a more Mediterranean distribution [3, 15], has wood that is considered of lower quality under oceanic climates [19], and thus its presence is undesirable in common ash stands (see [11] for OECD certification scheme of forest reproductive materials). Unfortunately, morphological characters frequently fail to distinguish individuals of the two species, particularly in zones of sympatry where interspecific hybridization has been suspected [18, 28]. Hence, different attempts have been made to distinguish the two ash species with molecular tools. Recently, a chloroplast microsatellite marker [10] was revealed to be of limited use because of the monomorphism observed in populations where both species and putative hybrids were present (Fernandez-Manjarrés and Gérard, unpublished results). This feature is common in forest tree species complexes like oaks, and can originate from a shared ancestral polymorphism or from recurrent gene flow and 'pollen swamping' [14]. On the other hand, Jeandroz et al. [6] developed nine quasi species-specific RAPD markers, which were used to detect putative hybrid individuals in a population from a zone of sympatry. Of the above markers, only two RAPD loci were robust in a further study [20]. Overall such markers have poor repeatability, and a way around these problems is the development of Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) markers [4]. Therefore, currently available molecular markers are not sufficient for ash species determination.

Even when molecular markers are efficient tools for discriminating closely-related species (e.g., [13]), useful information can also be obtained by examining physiological responses. Seeds of both ash species are known to exhibit dormancy, which is particularly long for *F. excelsior* (2 to 6 years) [23, 27, 28]. Following Nikolaeva [12], seeds of this species are characterized by an underdeveloped embryo and morphophysiological dormancy. The effect of storage conditions, temperature and stratification on the germination of *F. excelsior* seeds (e.g. [25, 26]), *F. angustifolia* seeds (e.g. [17, 24]) or both (e.g. [16, 19]) is well documented, and some studies had pointed out differences in the strength of dormancy between the two species [16]. Raquin et al. [19] compared the relative efficiency of germination of *F. excelsior* and *F. angustifolia* (with seed samples from one population of each species), applying three

different treatments and suggested that germination tests can be potentially used as a first test to separate the two species. The embryo/seed size ratio gives a first measure of the underdevelopment of the embryo, and this character is known to be involved in germination ability and evolution of seed dormancy [1, 2, 12]. Thus, multiple tests including physiological responses may be a more powerful and straightforward approach for identifying individuals of closely-related species.

The first aim of this study was to develop repeatable molecular markers: we obtained three SCARs from RAPD loci [6] and a microsatellite-derived marker. Then we assessed the utility of two of them, together with germination tests of *intact untreated* seeds and embryo/seed length ratios measurements, for distinguishing between these two closely-related ash species at the population level.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Molecular markers

2.1.1. Marker development

For all molecular tests, DNA was extracted with a DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen) from dried leaf material issued from 50 mg of fresh adult tree leaves (almost one leaflet per tree). Two individuals of each species on the Orsay campus, described in Morand-Prieur et al. [10], were used to perform the primary RAPD amplifications. DNA was amplified following the method described by Jeandroz et al. [6] in a MJ Research PTC-200 thermocycler, with primers OpL03 and OpH04 (Qiagen/Operon). Three *F. angustifolia*-specific bands were excised from a 1.5% agarose gel after Ethidium Bromide staining: OpH04 1600 bp and OpL03 750 bp described in Jeandroz et al. [6], and a new one, OpH04 300 bp. Fragments were purified using a QiAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) and cloned in a pDrive Cloning Vector®, before sequencing using M13 universal probes at Qiagen laboratories (Hilden, Germany). Homology searches were performed using the BLAST algorithm at *http://www.ncbi.nlm.nih.gov* (National Center for Biotechnology Information), with programs blastn, tblastn and tblastx. New primers were redefined on the three sequences FaH299, FaL757 and FaH1549 (Genbank Accession Numbers AY760060, AY760061 and AY760062, respectively) with Primer3 software [22]. Preliminary PCR tests were performed with 10 individuals of each species in 20 µl solution containing 0.5 units of Q-BIOgene *Taq* DNA Pol, 100 µM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.3 (Q-

BIOgene) and 0.5 µM of each primer. Amplifications were carried out using the following program: 94°C for 3 min; 45 cycles (1 min denaturation at 94°C, 30 s annealing, 1 min 30 s extension at 70°C); 72°C for 5 min (final extension). The annealing temperature was chosen at 58°C, 57°C and 58°C for FaH299, FaL757 and FaH1549 respectively, depending on the T_m of each primer (*Table I*).

Second, primers were defined on the flanking regions of the nuclear microsatellite locus Femsatl 19 (GenBank AN: AF020400 [7]) with Primer3 software, and the same PCR tests were carried out with an annealing temperature of 55°C.

2.1.2. Tests on population samples

Markers that showed frequency differences between the two species were tested on mature leaves of a total of 656 individuals from: eight *F. angustifolia* populations (mean number of individuals per population: 17.9), 21 *F. excelsior* populations (mean number of individuals per population: 19.1) and five populations (mean number of individuals per population: 25.4) from three areas of sympatry between these two species (*Table II*). A bi-marker phenotype was assigned to each individual (0 for the absence and 1 for the presence of the dominant marker). Four phenotypes were possible: 10, 11, 00 and 01. A Simple Correspondence Analysis (SCA) on a two-way contingency table was performed on the phenotypic composition of each population using procedure CORRESP in SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

2.2. Seed characteristics

Seeds were harvested on adult trees separated by 30 to 50 m. We had previously carried out a study in 2004 on samples from one population of each species (12 trees per population) to verify the stability of the results within a population (data not shown). These preliminary data conducted us to evaluate germination and embryo size patterns at a larger scale: three provenances of each species were chosen for the experiment in 2005, from which seeds of sufficient quantity and quality were available (*F. angustifolia*: three populations from La Mole-Cogolin, Cuxac d'Aude and Cazouls-lès-Béziers from Southern France, *F. excelsior*: three populations from Orsay campus natural vegetation, Dourdan forest and Alençon seed orchard from North-Western France). Three mother trees were chosen in each population. In addition, seeds were harvested on three mother trees in two populations from zones of sympatry in France (St-Dyé-sur Loire, Loire valley and Tavaux, Saône valley) to evaluate

germination ability and embryo/seed length ratio variation in comparison with the populations of the two species.

For germination tests, 160 seeds per mother tree were sown directly without any prior treatment in 40×40 cm boxes, containing a 1:1 mixture of leaf mould (Floradur®, Floragard) and chalk-less sand. Boxes were placed in the greenhouse under natural light conditions (Mean temperature: 18.5°C during winter 2005). Germinated seeds were counted every week during 16 weeks.

For embryo size measurements, 16 seeds per mother tree were re-hydrated and sterilized as described in Raquin et al. [19], and embryo length was measured under a Wild M5 stereomicroscope at magnification 6X. After verifying that the variable "embryo/seed length ratio" (E:S ratio) did not deviate from a normal distribution within samples of each species we compared E:S ratios between the two species using procedure NESTED in SAS, with mother tree nested within population nested within species (the samples from sympatry were not included in the analysis of variance). When analysing balanced data, this procedure allows determination of the amount of total variation explained by each level (factor) on the observed data [29].

3. RESULTS

3.1. Molecular markers

No homology with any sequence from nucleotide or translated databases was found along the three SCAR sequences. Of the three SCAR markers (*Table I*), only FaL757 was used further because FaH299 and FaH1549 were both present in all individuals tested in preliminary tests (data not shown).

The two markers FaL757 and that corresponding to the entire nuclear microsatellite Femsatl 19 locus (amplified with the primers described in *table I*, named F19Lg) were complementary, i.e. they were not present at high frequency in the same species (*Table II*). Among all samples, FaL757 was present at high frequency in *F. angustifolia* populations (70.6% of presence in the total sample), whereas it was almost absent from the *F. excelsior* populations (10.6% frequency in the total sample). Its frequency was 20% in the populations from zones of sympatry. On the other hand, F19Lg was present at very high frequency in *F. excelsior* populations (95%), but was rare in the *F. angustifolia* populations (15%). In sympatric populations, this marker had a frequency of 55% (*Table II*). The SCA (*Table III*)

allowed populations to be assigned to one of the two species: the proportion of the extreme phenotypes (10 and 01) determined the first axis (which explained 73.65% of the observed variation), while the second axis represented the proportion of intermediate phenotypes (00 and 11) and explained only 16.32% of the observed variation (*Figure I*). The populations from the zone of sympatry were distributed between the two groups, and the population of St-Dyé (S5) was a good example of a mixed population.

3.2. Seed characteristics

The percentages of germination obtained for populations of the two species and from the zone of sympatry (*Table II*) reinforced the results obtained by Raquin et al. [19] with depericarped, rehydrated and sterilized seeds. Germination was observed only for seeds of *F. angustifolia* (for all progeny arrays) and St-Dyé and Tavaux seed lots. Moreover, the mean germination rate was two-fold higher for *F. angustifolia* seeds than for seeds from zones of sympatry.

The E:S ratio did not deviate significantly from normality for either species (Cramer-von Mises test: W-sq = 0.06, $P > 0.25$ for *F. excelsior*, W-sq = 0.09, $P = 0.15$ for *F. angustifolia*). Values of E:S ratio were significantly higher in *F. angustifolia* populations (*Table II*): the level "species" explained 77% of the total observed variation ($F_{1,4} = 43.42$, $P = 0.0027$), the level "population" explained 1% of this variation ($F_{4,12} = 1.30$, $P = 0.33$, n. s.) and the level "mother tree" explained 12% ($F_{12,270} = 19.99$, $P < 0.0001$).

These results were in agreement with the preliminary data analysis on seeds of 2004 that were structured in only two levels, with the population and species levels being confounded (results not shown).

4. DISCUSSION

The two molecular markers we developed can be used under any laboratory conditions, contrary to the RAPD markers developed earlier [6, 10]. Not surprisingly FaL757 and F19Lg are not strictly species-specific, since these closely-related species sometimes hybridize and thus still exchange genes [5, 8]. Nevertheless, they allow discrimination between the two species at the population level. In zones of sympatry, it is preferable to use them concomitantly with the study of seed characters. For example, the Tavaux population (Saône valley) exhibits a large proportion of F19Lg, indicating *F. excelsior*-like provenance, but

some germinations were observed and E:S ratios were intermediate, indicating the presence of *F. angustifolia*-like genotypes. Indeed, this population has been shown to be mainly composed of morphologically *F. excelsior*-like individuals, but a small amount of introgression by *F. angustifolia* gene pool was detected (Fernandez-Manjarrés et al., submitted). On the other hand, the St-Dyé stand (Loire valley) can be robustly characterised as an admixed population as it exhibits both molecular markers in similar proportions, and intermediate germination rates and high E:S ratios. In an intensive local scale study, we demonstrated that this hybrid zone population was composed in a major part of *F. angustifolia* gene pool, and that parental species and different types of hybrids were present (Gérard et al., submitted). By extension, other combinations of marker frequencies and seed characteristics could signal other types of admixed or hybrid populations, since hybrid segregation usually produces a mosaic of morphological and molecular markers that can vary among hybrid zones, particularly relative to varying selection regimes [21].

The germination test is a simple way to detect the presence of narrow-leaved ash seeds, but the sample size needs to be sufficient and the results may depend on the damaging degree of the seed lot. We chose to conduct the test on intact samaras (seeds within the fruit), first because we wanted to know the ability of both species to germinate without any treatment at all, and second to be able to provide a straightforward means for managers to rapidly detect the presence of *F. angustifolia* seeds. But it is sometimes difficult to detect infected seeds without removing the pericarp [17]. Only empty samaras were removed from the samples. We also acknowledge that the number of sampled populations for the two seed experiments is not very large, although it covers a large geographic area. Nevertheless, germinations were observed in all *F. angustifolia* seed lots and no germination whatsoever was observed for any *F. excelsior* seed lots: it seems that stratification is absolutely necessary to remove first-year dormancy in *F. excelsior* seeds. These same germination patterns were also found across a broader range of *F. angustifolia* and *F. excelsior* provenances and similarly E:S ratios differed between the two species (Gérard and Raquin, unpublished results).

This investigation on ash seeds showed particular developmental characters of the species. The embryo made up a larger proportion of the seed in *F. angustifolia* and this species produces more vigorous seedlings during the first years of growth (Dufour, unpublished results). This could represent a better ability for colonizing newly open forest gaps or open habitats, and thus explain the replacement of common ash by narrow-leaved ash in some regions [9]. Embryo size also affects germination and dormancy. Morphological dormancy is due to underdevelopment of the embryo at the seed dispersal stage and is considered ancestral

in seed plants [1, 2]. Common ash seeds with their small embryos seem to exhibit morphophysiological dormancy [12] while narrow-leaved ash seeds appear to retain only physiological dormancy [16]: the embryo usually does not seem to be underdeveloped. The evolution towards large embryos in the seeds of this latter species may have been possible by changes in developmental timing (i.e. heterochrony [2]) possibly selected in *F. angustifolia* as an adaptation to Mediterranean ecological and climatic conditions. Indeed in a wide-scale study of these two species (some populations were the same as in the present study) and their hybrids, we showed that their range distributions are linked to environmental features such as altitude, number of frost days and annual mean temperature (Fernandez-Manjarrés et al, submitted).

In conclusion, we developed a set of robust and powerful tools for rapidly detecting the presence of *F. angustifolia* in the field or in seed lots, which could be easily applied by forest managers. The present set of markers allows us to distinguish the two species adequately and this discrimination improves with increasing sample sizes, which was not the case for earlier studies. Moreover, the present study points out possibly different ecological strategies of the two species that can be linked with their colonizing abilities (see [9] for *F. excelsior*). This can be useful for studies of hybridization in zones of sympatry and/or of putative replacement of common ash by narrow-leaved ash, for example in the context of global change.

Acknowledgements: We thank Céline Devaux, Marie-Elise Morand-Prieur, Jacqui Shykoff, Carol Baskin, Marc Masimbert and two anonymous reviewers for helpful comments on the manuscript and discussions, Francina Langa and Jérôme Artus (Pasteur Institute) for the use of their thermocycler, and Lionel Saunois for technical assistance. This work is a part of the PhD thesis of PRG financed by the French MENRT and the French Institute for Biodiversity (IFB). Financial support was provided by DGFAR (Ministry of Agriculture), IFB and European Commission (RAP Project QLK5-2001-00631) grants to NFL.

References

[1] Baskin C.C., Baskin J.M., Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, Academic Press, San Diego, 1998.

[2] Forbis T.A., Floyd S.K., de Queiroz A., The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy, Evolution 56 (2002) 2112-2125.

[3] Franc A., Ruchaud F., Le Frêne commun, in: (Ed.), Autécologie des feuillus précieux : Frêne commun, Merisier, Erable sycomore, Erable plane, C.E.M.A.G.R.E.F. Editions, Riom, France, 1996, pp. 15-68.

[4] Hernandez P., Martin A., Dorado G., Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat, Mol. Breed. 5 (1999) 245-253.

[5] Hey J., Waples R.S., Arnold M.L., Butlin R.K., Harrison R.G., Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation, Trends Ecol. Evol. 18 (2003) 597-603.

[6] Jeandroz S., Frascaria-Lacoste N., Bousquet J., Molecular recognition of the closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla* (Oleaceae) by RAPD markers, For. Genet. 3 (1996) 237-242.

[7] Lefort F., Brachet S., Frascaria-Lacoste N., Edwards K.J., Douglas G.C., Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae), Mol. Ecol. 8 (1999) 1075-1092.

[8] Mallet J., Hybridization as an invasion of the genome, Trends Ecol. Evol. 20 (2005) 229-237.

[9] Marigo G., Peltier J.-P., Girel J., Pautou G., Success in the demographic expansion of *Fraxinus excelsior* L., Trees 15 (2000) 1-13.

[10] Morand-Prieur M.-E., Vedel F., Raquin C., Brachet S., Sihachakr D., Frascaria-Lacoste N., Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*, Mol. Ecol. 11 (2002) 613-617.

[11] Nanson A., The new OECD scheme for the certification of forest reproductive materials, Silvae Genet. 50 (2001) 181-187.

[12] Nikolaeva M.G., On criteria to use in studies of seed evolution, Seed Sci. Res. 14 (2004) 315-320.

[13] Perron M., Gordon A.G., Bousquet J., Species-specific RAPD fingerprints for the closely related *Picea mariana* and *P. rubens*, Theor. Appl. Genet. 91 (1995) 142-149.

[14] Petit R.J., Bodénès C., Ducousso A., Roussel G., Kremer A., Hybridization as a mechanism of invasion in oaks, New Phytol. 161 (2004) 151-164.

[15] Picard J.-F., A propos du frêne oxyphylle, *Fraxinus angustifolia* Vahl., Forêt-Entreprise 83 (1983) 2-4.

[16] Piotto B., Effects of temperature on germination of stratified seeds of three ash species, Seed Sci. Technol. 22 (1994) 519-529.

[17] Preece J.E., Bates S.A., Van Sambeek J.W., Germination of cut seeds and seedling growth of ash (*Fraxinus* spp.) in vitro, Can. J. For. Res. 25 (1995) 1368-1374.

[18] Rameau J.C., Mansion D., Dumé G., Flore forestière française, guide écologique illustré. Tome 1. Plaines et collines, Institut pour le Développement Forestier, Paris, 1989.

[19] Raquin C., Jung-Muller B., Dufour J., Frascaria-Lacoste N., Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl.), Ann. For. Sci. 59 (2002) 219-224.

[20] Raquin C., Brachet S., Jeandroz S., Vedel F., Frascaria-Lacoste N., Combined analyses of microsatellite and RAPD markers demonstrate possible hybridisation between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl, For. Genet. 9 (2002) 103-111.

[21] Rieseberg L.H., Ellstrand N.C., What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization?, Crit. Rev. Plant Sci. 12 (1993) 213-241.

[22] Rozen S., Skaletsky H.J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, in: Krawetz S., Misener S. (Ed.), Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ, 2000, pp. 365-386.

[23] Steinbauer G.P., Dormancy and germination of *Fraxinus* seeds, Plant Physiol. 12 (1937) 813-824.

[24] Tilki F., Çiçek E., Effects of stratification, temperature and storage on germination in three provenances of *Fraxinus angustifolia* subsp. *oxycarpa* seeds, Turk. J. Agric. For. 29 (2005) 323-330.

[25] Tylkowski T., Mediumless stratification and dry storage of after-ripened seeds of *Fraxinus excelsior* L., Arbor. Kornic. 35 (1990) 143-152.

[26] Villiers T.A., Wareing P.F., Dormancy in fruits of *Fraxinus excelsior* L., J. Exp. Bot. 15 (1964) 359-367.

[27] Wagner J., Kafka I., Effects of medium composition on *in vitro* germination of embryos of *Fraxinus excelsior* at different stages of development, J. Plant Physiol. 146 (1995) 566-568.

[28] Wardle P., Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L., J. Ecol. 49 (1961) 739-751.

[29] Zar J.H., Biostatistical analysis, Second Edition, Prentice-Hall Inc., London, UK, 1984.

Table I. Sequence and characteristics of primers used.

Name[2] and sequence (5'→3')		Position[1]	Size (mers)	T_m (°C)	GC (%)
FaH299F	GGAAGTCGCCCTTAGACTTTG	1-21	21	59.8	52.4
FaH299R	GCCAAATGGCCTTACACAAC	273-292	20	57.3	50.0
FaL757F	CAGCTTGGTGAGCGATCC	5-22	18	58.2	61.1
FaL757R	CCAGCAGCTTCACAAGGTTA	738-757	20	57.3	50.0
FaH1549F	GAAGTCGCCGCTATCAAGTAA	2-22	21	57.9	47.6
FaH1549R	GGAAGTCGCCCTCTTTTGC	1531-1549	19	58.8	57.9
F19LgF	TTGATATAGGAATGCCAGAGC	3-23	21	57.0	42.9
F19LgR	CAGATACTCGCGTATGATGGTC	436-457	22	59.6	50.0

[1] Position in the SCAR-RAPD sequence.

[2] F and R represent forward and reverse primers, respectively.

Table II. Description of the study populations (sample size, origin, latitude, longitude). Absolute frequencies of bi-marker phenotypes are given, as well as mean percentage of germinations in population samples and mean E:S ratios.

Population	*N* [a]	Country	Code	Lat.	Long.	Bi-marker phenotypes [b]				% germ. [c]	E:S ratio [d]
						10	00	11	01		
F. excelsior											
Farchau	17	Germany	E1	53°41’	3°47’	0	1	0	16		
Hoge Bos	15	Belgium	E2	50°50’	2°57’	0	2	1	12		
Abetone	20	Italy	E3	44°11’	10°38’	0	1	0	19		
Cadore	14	Italy	E4	46°30’	12°28’	0	1	0	13		
Monti Lessini	20	Italy	E5	45°40’	11°13’	0	2	0	18		
Valle Pesio	20	Italy	E6	44°15’	7°39’	0	2	0	18		
Kasiadorys	20	Lituany	E7	54°51’	24°25’	0	2	0	18		
Zeimelio	20	Lituany	E8	56°16’	24°00’	0	3	1	16		
Rabstejn	18	Czech R.	E9	50°50’	14°20’	0	0	0	18		
Donadea	16	Ireland	E10	53°20’	6°45’	0	0	0	16		
Enniskillen	20	Ireland	E11	54°14’	7°28’	0	0	5	15		
Currachase	17	Ireland	E12	52°36’	8°53’	0	1	6	10		
Wytham	15	UK	E13	51°47’	1°20’	0	0	4	11		
Settrington	12	UK	E14	54°01’	0°69’	1	0	3	8		
La Romagne	20	France	E15	49°40’	4°19’	0	0	0	20		
Athis	20	France	E16	49°01’	4°07’	0	2	3	15		
St-Gatien	19	France	E17	49°21’	0°11’	0	1	3	15		
St-Paul-de-S.	21	France	E18	45°08’	2°31’	0	0	3	18		
Dourdan	20	France	E19	48°31’	2°00’	0	0	0	20	0 (0)	0.50 (0.07)
Orsay	8	France	E20	48°42’	2°11’	0	0	1	7	0 (0)	0.51 (0.10)
Alençon	24	France	E21	48°29’	0°07’	0	0	9	15	0 (0)	0.46 (0.07)
Overall	376					1	18	39	318	0 (0)	0.49 (0.08)
F. angustifolia											
Alter do Chao	20	Portugal	A1	39°12’	7°40’	14	4	1	1		
Boujan-sur-L.	23	France	A2	43°23’	3°14’	14	4	5	0		
Grabels	18	France	A3	43°39’	3°47’	7	7	2	2		
Mas-Larrieu	24	France	A4	42°36’	3°02’	17	4	3	0		
Cogolin	10	France	A5	43°12’	6°28’	6	3	1	0		
La Mole	10	France	A6	43°25’	6°53’	5	1	3	1	4 (3)	0.69 (0.09)
Cuxac d’Aude	24	France	A7	43°16’	2°59’	10	11	2	1	18 (14)	0.71 (0.08)
Cazouls-lès-B.	24	France	A8	43°25’	3°07’	17	6	1	0	20 (11)	0.80 (0.09)
Overall	153					90	40	18	5	14 (12)	0.73 (0.10)
Zone of sympatry											
Hohenau	9	Austria	S1	48°36’	16°55’	0	3	0	6		
Rigny	30	France	S2	47°28’	5°38’	1	15	0	14		
Tavaux	20	France	S3	47°02’	5°24’	1	5	2	12	2 (2)	0.59 (0.08)
St-Pryvé	20	France	S4	47°53’	1°52’	0	3	3	14		
St-Dyé-sur-L.	48	France	S5	47°39’	1°29’	14	15	5	14	12 (10)	0.70 (0.11)
Overall	127					16	41	10	60	7 (8)	0.65 (0.11)

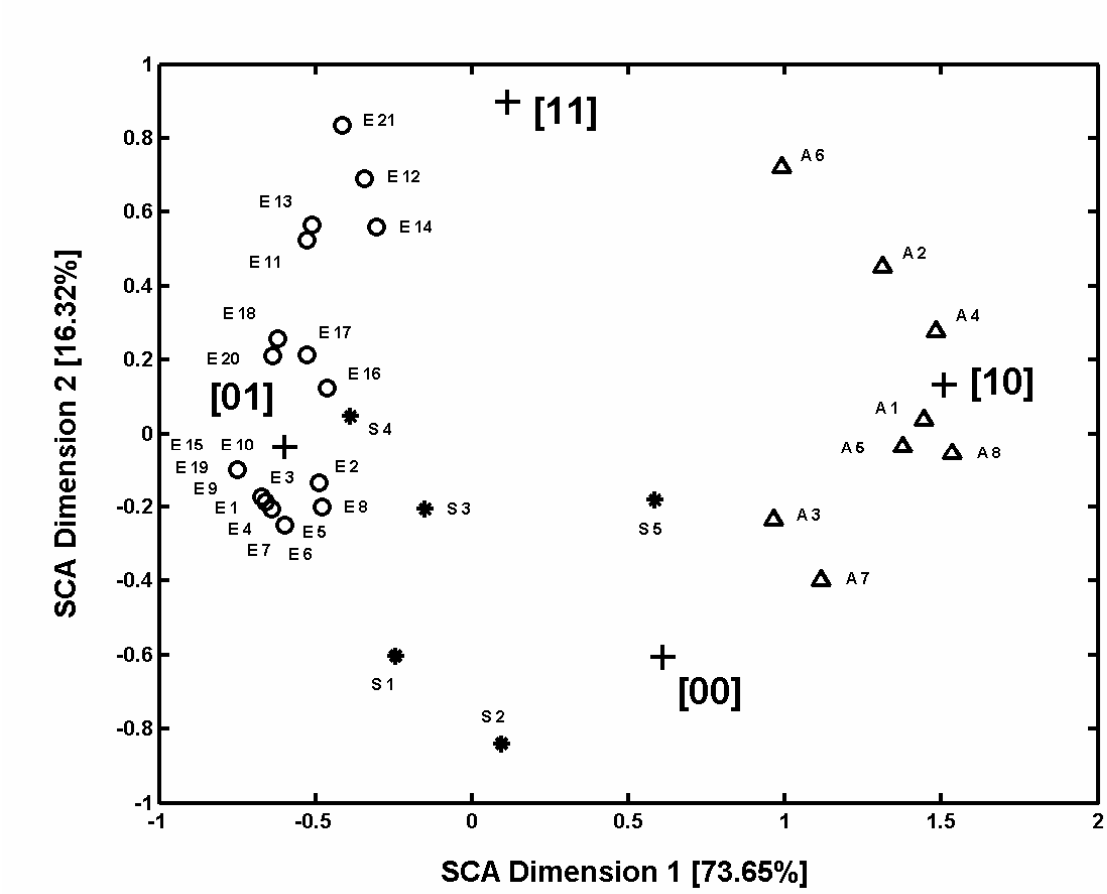
[a] Sample size for molecular marker analysis.
[b] The first number represent the phenotype presence (1) / absence (0) of FaL757, and the second number that of F19Lg.
[c] Mean percentage of germinated seeds (standard deviation).
[d] Mean embryo/seed length ratio (standard deviation).

Table III. Inertia and chi-square decomposition of the Simple Correspondence Analysis (SCA).

Singular Value	Principal Inertia	Chi-square	Percent	Cumulative percent
0.79839	0.63742	418.150	73.65	73.65
0.37581	0.14123	92.648	16.32	89.97
0.29464	0.08681	56.948	10.03	100.00
Total	0.86547	567.746	100.00	d.f.[a] = 99

[a] Degrees of freedom.

Figure 1. Simple Correspondence Analysis (SCA) on bi-marker phenotypes. Circles represent *F. excelsior* populations, triangles represent *F. angustifolia* populations and stars represent populations from zones of sympatry (codes are listed in *table II*). Crosses are plotted at the coordinates of the four phenotypes in the first two dimension of the SCA (the first number in the brackets represent the phenotype presence (1) / absence (0) of FaL757, and the second number that of F19Lg). The percentages of the total inertia provided by the first two dimensions are shown in brackets on each axis.



Discussion

Ces travaux ont apporté des outils efficaces pour les gestionnaires forestiers, permettant de détecter la présence de *F. angustifolia* à l'échelle de la *population*. Cependant, ils reflètent la difficulté de différencier strictement des taxons « flous » sur la base de marqueurs moléculaires. Lorsque deux espèces ont une histoire commune récente et échangent encore des gènes, elles partagent souvent beaucoup de patrimoine génétique. Ces marqueurs seront donc moins efficaces pour repérer précisément différentes classes d'hybrides en populations naturelles (F1, F2, *backcrosses*…) et la différenciation des espèces ne pourra se faire qu'à l'aide d'analyses multivariées en combinant des caractères morphologiques et génétiques (voir Chapitres 2 et 3). Ces résultats ne sont somme toute pas surprenants pour des arbres forestiers phylogénétiquement très proches, comme c'est le cas par exemple pour les chênes européens (Muir & Schlötterer 2004; Petit et al. 2004). Des marqueurs moléculaires soumis à sélection disruptive seraient certainement plus efficaces pour différencier les espèces (voir Discussion générale).

D'autre part, ces travaux ont permis de mettre en évidence des caractères de dormance divergents, pouvant être reliés à des tailles différentes d'embryons dans la graine (E:S). Cette corrélation entre le rapport E:S et la rapidité de germination a déjà été montré, par exemple pour des espèces de climat méditerranéen d'Amérique Centrale (Vivrette 1995). Chez les angiospermes, l'augmentation du rapport E:S est une tendance évolutive générale : des reconstructions phylogénétiques sur 179 familles suggèrent que l'ancêtre commun aux angiospermes devait montrer un rapport E:S de l'ordre de 16% alors que la moyenne sur les branches terminales est d'environ 52% (Forbis et al. 2002). La tendance générale est à l'augmentation même s'il existe certains cas de réversion. Cette augmentation pourrait être une adaptation à des environnements devenant plus favorables à la germination, et en ce sens des études sur espèces proches prenant en compte l'écologie de chacune sont utiles pour mieux comprendre l'évolution du rapport E:S. Dans le cas des frênes, de l'information pourrait être gagnée en comparant les rapports d'une ou plusieurs espèces se branchant directement sur le couple *F. angustifolia* / *F. excelsior*, comme *F. xanthoxyloides*, *F. palissae* ou *F. ornus*, en prenant en compte leurs écologies. Par ailleurs, une étude phylogénétique récente montre que l'augmentation du rapport au cours de l'évolution des angiospermes n'est pas corrélée à une augmentation de la vitesse de germination : elle pourrait simplement résulter de contraintes statistiques. En effet, étant donné que la variable E:S est bornée entre 0 et 1, que la valeur de l'ancêtre commun est proche de 0, et que les angiospermes se sont

diversifiés extrêmement rapidement, la tendance ne peut aller que vers l'augmentation du rapport du à la très forte augmentation de la variance phénotypique (i.e. diffusion dans un espace structuré) [Verdu 2006]. Mais cette étude ne prenait pas en compte d'autres paramètres comme le type de dormance ou le type d'habitat. Etant données les valeurs du rapport pour *F. excelsior* (autour de 50%), et la force de la dormance, on peut supposer que s'il y a relation entre E:S et vitesse de germination, elle ne soit pas linéaire. Seuls les très grands rapports E:S permettraient la levée de dormance rapide, du à la perte du caractère morphologique de la dormance.

Quoi qu'il en soit, les résultats présentés ici suggèrent de fortes potentialités colonisatrices pour *F. angustifolia* si les conditions sont favorables et la compétition pas trop intense. Par ailleurs des mesures de levée de dormance, de survie et de croissance des semis en transplantations réciproques apporteraient des informations supplémentaires cruciales.

RÉFÉRENCES

Forbis, T. A., S. K. Floyd & A. de Queiroz. 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. Evolution 56:2112-2125.

Jeandroz, S., N. Frascaria-Lacoste & J. Bousquet. 1996. Molecular recognition of the closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla* (Oleaceae) by RAPD markers. For. Genet. 3:237-242.

Morand-Prieur, M.-E., F. Vedel, C. Raquin, S. Brachet, D. Sihachakr & N. Frascaria-Lacoste. 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. Mol. Ecol. 11:613-617.

Muir, G. & C. Schlötterer. 2004. Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). Mol. Ecol. 14:549-561.

Petit, R. J., C. Bodénès, A. Ducousso, G. Roussel & A. Kremer. 2004. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. New Phytol. 161:151-164.

Raquin, C., S. Brachet, S. Jeandroz, F. Vedel & N. Frascaria-Lacoste. 2002a. Combined analyses of microsatellite and RAPD markers demonstrate possible hybridisation between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. For. Genet. 9:103-111.

Raquin, C., B. Jung-Muller, J. Dufour & N. Frascaria-Lacoste. 2002b. Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl.). Ann. For. Sci. 59:219-224.

Verdu, M. 2006. Tempo, mode and phylogenetic associations of relative embryo size evolution in angiosperms. J. Evol. Biol. in press

Vivrette, N. J. 1995. Distribution and ecological significance of seed-embryo types in Mediterranean climates in California, Chile, and Australia. Pp. 274-288 *in* M. K. T. Arroyo, P. H. Zedler & M. D. Fox, eds. Ecology and Biogeography of Mediterranean Ecosystems in Chile, California and Australia. Springer Verlag, New York.

CHAPITRE 2

ZONES HYBRIDES ET VARIATIONS CLIMATIQUES

L'hybridation étant donc soupçonnée depuis longtemps en Val de Loire et en Vallée de Saône (Picard 1983), ces régions ont été choisies en premier lieu pour détecter la présence d'hybrides et étudier la structuration des populations. Deux transects ont été échantillonnés le long de ces vallées : celui du Val de Loire part de l'embouchure du fleuve, où *F. angustifolia* semblait être seul présent, jusqu'à la région d'Orléans, où *F. excelsior* semblait être seul présent. Le transect de la Vallée de Saône est moins linéaire, des populations ayant été échantillonnées dans la vallée et sur les contreforts (voir carte p. 89), et se termine avant le confluent avec le Rhône. Des populations de références des deux espèces ont été échantillonnées dans le Nord de la France (*F. excelsior*) et en Languedoc (*F. angustifolia*). Etant donnée la distribution des espèces à l'échelle de la France, nous avons testé l'influence des conditions climatiques sur la répartition des populations des deux espèces et des populations mixtes, et sur les différents *patterns* d'hybridation. Ces travaux ont fait l'objet de la publication d'un article, accepté dans *Molecular Ecology*.

Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *F. angustifolia* Vahl. (Oleaceae) in Eastern and Western France

J. F. FERNANDEZ-MANJARRES[1], P. R. GERARD[1], J. DUFOUR[2], C. RAQUIN[1], N. FRASCARIA-LACOSTE[1]

[1]Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, UMR CNRS-UPXI-ENGREF 8079, Bât 360, Université Paris XI, 91405 Orsay Cedex, France
[2]Unité Amélioration, Génétique et Physiologie forestières, BP 20619 45166 Olivet Cedex, France

Abstract

We examined large-scale patterns of morphology, genetic structure and ecological correlates of *Fraxinus excelsior* and the closely related species *F. angustifolia* in France, in order to determine the degree of hybridization between them. We sampled 24 populations in two putative hybrid zones (Loire and Saône), and five control populations of each species. We measured foliar characteristics of adult trees and used five nuclear microsatellites as molecular markers. Canonical discriminant analysis indicated that the two species differ in morphology, but that intermediate types are common in the Loire region but less frequent in the Saône region. Bayesian population assignment identified one *F. angustifolia* and two *F. excelsior* gene pools. Most Loire individuals clustered genetically with the *F. angustifolia* gene pool. In contrast, the Saône region presented individuals belonging mostly to *F. excelsior* pools, although the *F. angustifolia* type was frequent in certain populations. The lowest F_{st} values were found between the Loire and *F. angustifolia* controls that also exhibited no significant isolation by distance. The proportion of the *F. angustifolia* gene pool in each locality was negatively correlated with winter temperatures, suggesting that a cold climate may be limiting. Hybridization is probably favored by the intermediate climatic conditions in the Loire region that allow both species to occur, but is somewhat hampered by the harsher winters in the Saône area where morphological introgression has apparently not yet occurred.

Introduction

The origin of large scale hybridization patterns in closely related species are difficult to understand as multiple processes may have given rise to the present-day distribution of species and their potential hybrids. In the northern hemisphere for example, historical species distribution was influenced by multiple isolation and recolonization events during the glacial events of the Quaternary Period (e.g., Williams *et al.* 2004) that largely shaped the genetic structure of parental and hybrid populations (Hewitt 2004). In particular, population divergence may have occurred during cold periods when populations survived in refugia where the combined effects of drift and local selection may have favored within-species divergence (Soranzo *et al.* 2000; Davis & Shaw 2001; Brewer *et al.* 2002; Petit *et al.* 2003). However, during expansion periods, populations may have continued to evolve as individuals began to exploit new niches, taking advantage of the ecological opportunities present in unsaturated floras with low levels of competition (Monasterio 1991; Levin 2003a, 2003b). Thus, the present patterns of hybrid populations reflect the likelihood of colonization of such expanding lineages, largely determined by the spatial distribution of favorable habitats and the diversity surviving in refugia, but it is still difficult to determine the unambiguous origin of differences among the lineages.

Given enough time, the distribution of neutral markers in the present range of a species may reflect the levels of gene flow among hybridizing groups and the probable environmental associations that have promoted (or limited) the possibility of gene exchange among groups. For example, in *Quercus* spp. in North America, the association between levels of admixture and climatic variables has provided indirect support for environmental selection, because specific molecular markers were more frequent in regions that corresponded well with the habitat preferences of each species and their potential hybrid populations (Dodd & Afzal-Rafii 2004). Morphological introgression on the other hand, may follow distributions which differ from those of neutral markers, because the morphological traits may be controlled by other, independent genes and be subject to selection. Thus, large scale hybridization patterns may not always display concordance between neutral markers that in principle have no barriers to introgression among groups, and morphological types that may be heavily influenced by local conditions.

Fraxinus excelsior L. (common ash) and *F. angustifolia* Vahl. (narrow-leaved ash) (Oleaceae) are two widespread trees in Western Europe whose present distribution suggests an important influence of isolation and recolonization processes shaped by different ecological preferences. Common ash abounds in Central and Northern Europe towards the Atlantic seaboard, being

gradually replaced towards the Mediterranean basin by the narrow-leaved ash. Common ash grows in well-drained soils on low and middle elevation hills, while narrow-leaved ash prefers areas along rivers where flooding may occur (Marigo *et al.* 2000). In France, *F. excelsior* normally flowers during the first two weeks of March and disperses its samaras in the fall of the same year, while *F. angustifolia* begins flowering in late December and disperses the seeds late in the fall. Seed dormancy appears to be frequent in the common ash for up to six years, but seems to be almost non-existent in the narrow-leaved ash (Wardle 1961). The present-day distribution of these two species indicates a long contact zone where hybridization may occur, running from Turkey to Northern Spain and Portugal in the Mediterranean basin.

Evidence of hybridization between these species has been obtained from frequent observations of intermediate morphologies (Rameau *et al.* 1989), the genotyping of natural populations with RAPD markers (Jeandroz *et al.* 1996) and experimental crosses (Morand-Prieur *et al.* 2002; Raquin *et al.* 2002). It is worth pointing out that artificial hybridization requires the storage of pollen from *F. angustifolia* because it usually flowers several months before the common ash.

Pollen records show that an undifferentiated pollen type that can not be assigned exclusively to either species was mainly concentrated in northern Italy, south of the Alps, about 15000 yr bp (Huntley & Birks 1983). Later, during retreat of the glaciers at about 6000 yr bp, three groups of *Fraxinus* were present: one north of the Iberian Peninsula on the Mediterranean side, one northeast of the Alps in northern Italy, and one in the Balkans. These groups putatively gave rise to the present day *F. excelsior*, *F. angustifolia*, and *F. oxycarpa,* respectively. At least with respect to the common ash, chloroplast haplotype distribution and nuclear microsatellites have confirmed a postglacial expansion from southern refuges (Heuertz *et al.* 2004a; 2004b), but the historical phylogeography of *F. angustifolia* remains unknown. Both species share at least three chloroplast haplotypes, suggesting a close evolutionary history of the common ash and *F. angustifolia* (Fernández-M. & Gerard, unpublished data; Vendramin, pers. comm.) Indeed, both species cluster closely in phylogenetic analyses (*e.g.* Jeandroz *et al.* 1997; Wallander & Albert 2000).

Using morphological and nuclear microsatellite data, we examined the extent and magnitude of hybridization between *F. angustifolia* and *F. excelsior* populations in continental France. The specific questions we addressed were: 1) what is the morphological and genetic structure of *F. excelsior*, *F. angustifolia* and putative hybrid populations? 2) Is morphological structure related to genetic groupings? And 3) if so, what are the ecological variables that may determine the distributions of any groups found?

Materials and Methods

Population samples

Samples were collected in Central France in 2002 to 2004 at 34 sites, focusing on the Loire valley and the Saône region (Table 1). The Loire valley runs east-west from North Central France to the Atlantic, and is an extensive plain without any significant mountain systems. Samples from the Loire zone were mainly collected along riverbanks, except for those from Seiches (population 18, Fig. 1). The Saône region of Eastern France is more heterogeneous as it includes a valley that runs southwards, surrounded by mountains of 600 m or more which give the area a more continental climate. The Saône River drains into the Rhône River that runs into the Mediterranean. Various preliminary morphological observations had suggested the existence of *F. angustifolia* and/or putative hybrid individuals in these areas. At each site, we selected an adult ash tree at random as the starting point of the sampling. We then sampled the closest tree within 30 m of the starting point. The procedure was repeated in a straight line, if possible, until around 30 trees had been identified (Table 1). Trees were sampled regardless of their resemblance to either species.

Control populations

As a control for *F. excelsior* we used the Dourdan forest in North-central France, which has been thoroughly studied (Morand *et al.* in prep.). This population is situated on a low elevation plateau, and geographically pertains to the Parisian basin that drains to the Seine River. In addition, four populations were sampled in Eastern (Morschwiller) and Central Northern (St Gatien, La Romagne, and St Martin d'Ablois) regions of France, all of them considered as good *F. excelsior* provenances (Bilger *et al.* 1995). The eastern-most population of Morschwiller (population 14, Table 1, Fig. 1) was included in the Saône group because of its geographical proximity to mountain populations in this area.

As controls for *F. angustifolia,* we sampled one population in the Tech valley close to the Pyrenees and four populations to the west of the Rhône River (Table 1, Fig. 1). The southern-most population of the Pyrenees coincides approximately with the satellite population that appeared 6000 yr bp, and which may have given rise to the *F. angustifolia* group (*sensu* Huntley & Birks 1983).

Morphological data

The minimum and maximum numbers of leaflets on each tree were determined, as well as the length and width of one of the second leaflet next to the terminal one. Tree diameter at breast height (DBH) was also recorded. Generally, adult trees with 9 to 13 rather elliptical leaflets are a fairly good indicator of common ash (*F. excelsior*), while individuals with 5 to 7 lanceolate leaflets belong to the narrow-leaved ash, *F. angustifolia* (J Dufour pers. obs.). Floral morphology is identical in both species, rendering it useless for group discrimination, although *F. excelsior* may present female or male flowers through a reduction of stamens or stigmas respectively, while *F. angustifolia* bears both. Phenological traits, which constitute a possible means of discriminating both species and hybrids, have been intensively recorded during a parallel, two-year study (Gerard *et al.* submitted) of the hybrid population in St Dye (population 21, Fig. 1).

Molecular methods

Total DNA was extracted from 25 to 50 mg dried leaf disks of 12.5 mm diameter and immediately soaked in 2 ml of a 1:1 solution of pure ethanol and acetone in Eppendorf tubes. The samples were left for 24 to 48 hours and then the solution was poured out and the tubes left open to dry. DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit ® (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. We used five primer pairs of nuclear microsatellites (FEMSATL 4, FEMSATL 11, FEMSATL 16, FEMSATL 19 and M2–30; Brachet *et al.* 1999; Lefort *et al.* 1999) that had previously been used successfully to characterize common ash populations (Heuertz *et al.* 2001, 2004a; Morand *et al.* 2002). Molecular biology methods follow Morand *et al.* (2002).

Statistical analyses

Zones (Loire, Saône, common ash controls and narrow-leaved ash controls) and populations were compared with respect to morphological characters with ANCOVA, using the DBH as the covariable to account for tree size. We analyzed the minimum and maximum numbers of leaflets per tree, the average number of leaflets per tree, leaflet length, leaflet width, and the arc-sine transformed leaflet length/width ratio. We also used the derived variables of the leaflet area

(estimated by multiplying the length and width of the leaflet observed) and the total leaf area (estimated by multiplying the leaflet area by the average number of leaflets per tree). We acknowledge that derived variables are correlated with the original variables, but we considered that an estimate of the total leaf area was crucial to our analyses.

In order to characterize species and putative hybrids, these morphological characters were also employed in a Canonical Discriminant Analysis (CDA) using PROC DISCRIM (SAS V8) with the population as the classification variable. We also recorded the _INTO_ variable provided by the output of the discriminant analysis that classifies individuals as a function of the posterior probabilities of canonical scores in one of the predefined populations.

Genetic analyses

The number of alleles A, effective number of alleles A_e, observed heterozygosity H_o, expected heterozygosity H_e, population inbreeding coefficient f_{is}, and population differentiation F_{st} were all estimated using GenePop v3.4 (Raymond & Rousset 1995). Standard deviations of the estimated parameters were obtained by bootstrapping the original data 1000 times with replacement. We also estimated population differentiation (F_{st}) and tested for isolation by distance (IBD) by comparing the pairwise F_{st} /(1 - F_{st}) matrix to the log of the pairwise values of geographical distances, using the Mantel test with 1000 permutations. Finally, we determined population genetic distances using the parameter $(\Delta\mu)^2 = (\mu_x - \mu_y)^2$, defined as the squared difference in allele size of any two populations (Goldstein *et al.* 1995).

We performed population assignment using the Bayesian methods implemented in the software Structure v2.0 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003). This is a clustering method that uses multi-locus data from a sample of individuals to infer population structure. Individuals are assigned probabilistically to one of the predefined K populations (gene pools), being the prior hypothesis $1/K$ for each individual. The program was run with 10000 iterations as the burn-in period, and 100000 iterations for Markov Chain convergence. Population origin was taken into account in the analysis and allele frequencies were set as being un-correlated. Previous runs without considering population origin and correlated allele frequencies had yielded results which were similar to those obtained with the chosen settings.

Ecological correlations of genetic groups

In order to detect any ecological determinants of the genetic groups found by the Structure software, we performed a canonical correlation analysis (CCA) at the population level. Although climatic variables (i.e. altitude and mean temperature) and genetic groupings may be correlated among themselves, canonical correlation allowed us to detect spurious results because the model is only valid if a between-groups correlation (genetic and ecological) is stronger than any within-group correlation. Thus, the average per population percentages of genetic clusters from the Structure output were correlated with the altitude of the sampled population, the mean annual temperature, mean January and July temperatures (strength of winter and summer respectively), precipitation and number of frost days. Analyses were conducted using PROC CANCORR (SAS V8, SAS Institute, NC). The same ecological variables were also used for visual inspection of the climatic characteristics of each population by its principal components using PROC PRINCOMP from the same software package.

Results

Morphological data

All morphological variables exhibited significant effects with respect to populations the most significant being the minimum leaflet number ($F_{34,\ 863} = 20.55$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.46$), and leaflet area ($F_{34,\ 863} = 17.63$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.42$). Results were similar for zones (Loire, Saône, and control populations) indicating significant differences among these large regions (see Table 2 from online supplementary material). The minimum number of leaflets appeared to be about five in *F. angustifolia* control populations, and nine or more in *F. excelsior* control populations. Saône valley populations had up to 11 leaflets, while populations in the Loire valley tended to have about seven leaflets, except for those in St Pryvé and Seiches which had nine (see Table 1 in the online supplementary data). Leaflet size was smaller in the narrow-leaved ash (~70x20 mm) when compared to common ash control populations or some populations in the Saône valley with much larger leaves (*e.g.* Vernois sur Mance ~90 mm x 32 mm). Again, Loire individuals displayed intermediate sizes. The leaflet length/width ratio tended to increase in northern and eastern populations, suggesting more rounded leaves for ashes growing in more temperate areas. All

morphological characters appeared to be unaffected by tree size, as the DBH was statistically non-significant regarding all the variables examined (results not shown).

The CDA yielded four out of seven significant canonical correlations that explained 95.9% of the variation in the model, the first canonical correlation contributing 71.3% (Table 2A). This first canonical variable had a correlation of 90.6% with the minimum leaflet number and a correlation of 82.4% with the average number of leaflets per population. The second canonical variable had a correlation of 68.0% with the total leaflet area, and 61.2% with leaflet width, suggesting that discrimination in this axis was closely related to total leaf size. Finally, the third canonical correlation had the highest input from the leaflet length/width ratio (56.1%), suggesting that leaf shape (ranging from oval to lanceolate) also determined group characteristics (Table 2B).

The control populations of *F. excelsior* and *F. angustifolia* exhibited the most marked morphological differentiation, and formed two separate groups that nevertheless overlapped at the extreme of their distribution (Fig. 2A, 2B). Individuals from the Saône valley lay within the "*excelsior*" side of the distribution (Fig. 2C) indicating that there were no intermediate morphological individuals in that region. In fact, many Saône individuals displayed morphologies that differed from both control populations, primarily because of the presence of numerous and large leaflets (see Table 1 in additional online content). Most of the Loire valley individuals exhibited clear hybrid morphologies with intermediate values between the chosen control populations (Fig. 2D). Individual examination of the histograms per population showed that two populations from the Loire valley displayed mostly an "*excelsior*"-like morphology: in Seiches, which is situated at distance from the Loire, and St Pryvé, the northernmost and easternmost sampled population. The distribution of the other canonical variables was less clear-cut, with broad variations regarding the second axis in Saône populations that did not exist in other groups, while individuals largely overlapped in the third canonical axis (results not shown).

Multivariate classification of individuals according to their canonical scores (_INTO_ variable output from the CDA) placed 80% of the trees sampled in *F. angustifolia* control populations within the same control populations, 18% of individuals in the Loire zone and 2% elsewhere. Among common ash control populations, only 43% were classified within control populations, 32% within the Saône region, 24% within the Loire, and only 1% within *F. angustifolia* populations. Individuals from the Saône populations were also mainly classified within their own zone (69%), followed by the Loire (17%), common ash control populations (13%) and only 1% within *F. angustifolia* controls. Loire individuals were also mostly classified in their own zone (63%),

followed by the Saône (17%) and narrow-leaved ash controls (13%), and only 6% in the common ash controls. This classification reinforces the notions that morphology barely overlapped between the chosen control populations (about 1%), that more *F. angustifolia*-like individuals were found in the Loire than in the Saône regions (13% vs. 1%), and that morphology was highly specific to zones.

Genetic diversity and structure

Nuclear microsatellite variability in all sampled zones was comparable to that found in other European populations (Table 3), but a reduced number of alleles (both effective and total) was found in control populations of *F. angustifolia* (A = 24.2). Intermediate values of allelic richness were found in Loire populations (A = 33.6) and in common ash control populations (A = 37.4), and the highest level being in the Saône zone (A = 56.2). This pattern also applied to standardized minimum sample sizes, where the upper limit of the standard deviation overlapped more or less with the lower limit of the distribution of bootstraps (results not shown), thus confirming the trend observed in raw values. Heterozygote deficiency values were lower for *F. angustifolia* (0.087), intermediate in the Loire valley (0.132) and *F. excelsior* populations (0.154), and much higher for the Saône valley (0.192). High f_{is} values in common ash can be explained by skewed sexual type ratios (Miyamoto *et al.* in preparation) that are unknown in *F. angustifolia*.

Values for the overall genetic structure in all 34 populations were moderate (F_{st} = 0.0428). Pairwise values among species and zones (Table 4) were smallest between *F. angustifolia* control populations and the Loire (F_{st} = 0.028), and biggest between Saône and Loire zones (F_{st} = 0.045). Similarly, IBD was always significant, except when comparing *F. angustifolia* and the Loire valley, suggesting extensive gene flow between southern, Mediterranean France and the Loire. Interestingly, northern populations of *F. excelsior* exhibited significant IBD with Saône valley populations, indicating that within common ash, IBD can also be present. Our F_{st} values were similar to those reported for the common ash in France (F_{st} = 0.043, Morand *et al.* 2002), but lower than those from Bulgaria (F_{st} = 0.087, Heuertz *et al.* 2001) and in a comparison between the Balkans and the British Isles (F_{st} = 0.078, Heuertz *et al.* 2004). The mean divergence of populations between control *F. angustifolia* and common ash populations was estimated at ($\Delta\mu^2$) = 93.3. In relative terms, Loire populations and the narrow-leaved ash appeared to display equal divergence,

and Saône populations and the common ash appeared to be four to five times more divergent (results not shown).

Population assignment

Population assignment suggested that three was the most likely number (*K*) of gene pools. The results of iterations showed a rapid increase from panmixis, attaining a maximum at $K = 3$ (*ln*(Probability of data) = -23825, SD = 20.9). For values of $K > 3$, the variance of the likelihood estimates became much larger than with $K = 2$ or 3 (results not shown). For $K = 2$, gene pools were clearly divided into homogeneous *F. excelsior* and *F. angustifolia* control populations, showing a widespread presence of the latter in the Loire valley and in some Saône valley populations. With $K = 3$ possible gene pools, the clustering of "*excelsior"*-like individuals was broken down in two groups, one containing numerous individuals from the highest elevation sampling sites in the Saône, and one containing common ash control populations (see Fig. 3 for the average gene pool composition of populations). For most of the analyses and in the discussion, we will be focusing on the "*angustifolia*" component in order to evaluate the degree of molecular introgression of this species into the common ash, bearing in mind the presence of two "*excelsior*" components in the total gene pool. On average, individuals from the common ash control populations contained 22% (SD = 8%) of the *F. angustifolia* gene pool, those from the narrow-leaved ash contained 75% (SD = 3%), Saône region trees contained 21% (SD = 15%) and those from the Loire 59% (SD= 16%).

From a marker perspective, it was observed that grouping was achieved by the presence of small alleles around 130 bp in *F. angustifolia* for FEMSATL 19, and less than 160 bp for M2-30, some of them private to *F. angustifolia*. This tendency for small alleles in the narrow-leaved ash has been confirmed in other samples (Gerard *et al.* submitted) and appears to be a good indicator for the species, at least in French populations.

Joint consideration of morphological structure and the amount of the "*angustifolia*" gene pool indicated that the majority of individuals from the control populations in each species clustered in opposite places, but that overlapping of extreme genotypes and/or morphologies was possible (Fig. 4A). Most of the individuals from the Saône valley displayed morphologies and genetic types close to *F. excelsior* control populations (Fig. 4B), while Loire valley individuals more frequently exhibited a significant proportion of the *F. angustifolia* gene pool (Fig. 4C). We also found that our

chosen *F. excelsior* populations possessed about 22% of the narrow-leaved ash gene pool, indicating the possibility of gene flow between species in Northern-Central France.

Ecological correlations

Overall canonical correlation analysis (CCA) between the population-level proportion of gene pools and ecological variables was highly significant (Wilk's *Lambda* = 0.096, $F_{24, 67.3} = 3.49$, $p < 0.001$). Of the three possible correlations, only the first was significant (3.49, $p < 0.001$) explaining 78% of the variation (Table 5A). This canonical correlation (0.887) was higher than any of the correlations within the two sets of variables (results not shown), thus validating use of the model. Standardized canonical coefficients indicated that the first canonical variable was a weighted difference of loadings in the "*angustifolia*" group, followed closely by the "*excelsior* 2" group and then by the "*excelsior* 1" group (12.78, 12.53 and 11.30, respectively). The correlation between the "*angustifolia*" group and the first canonical variable was negative (-0.887), but it was positive for the two "*excelsior*" groups, suggesting opposite responses of the gene pools to ecological conditions (Table 5B). The first transformed ecological variable was mainly made up of the average temperature, number of frost days and mean January temperature (loadings of -1.35, -0.97, -0.60, respectively). Altitude, latitude, longitude and July temperature contributed less, while rain was the least informative of all. The first canonical correlation revealed that the January temperature was the most strongly correlated ecological variable (-0.83), followed closely by altitude (0.80), mean temperature (-0.76), and frost days (0.73). Latitude, longitude, precipitation, and July temperature were moderately correlated and with the same magnitude (0.50-0.60), except for the July temperature, where the correlation was negative (Table 5B). Thus, the multivariate correlation suggested that *F. angustifolia* may be limited by severity of the winter, altitude and by mean temperatures during the year, while opposite trends applied for the common ash groups.

Ecological characteristics of sampling sites

PCA of the data from meteorological stations sited nearest to the sampled populations revealed distinct climatic conditions at the sampled sites, with Loire valley stations intermediate between the north-eastern and the south-eastern populations, and South and Saône zones representing extreme climatic conditions (Fig. 5). Because the first principal component for climatic data was correlated

mostly with the temperature in January (0.458), the number of frost days (-0.442) and the mean temperature (0.440), this axis represented a generally cold to warm weather gradient. The second axis was positively correlated to July temperature (0.617) and the amount of precipitation (0.613), suggesting a gradient towards warmer and wetter summers. Thus, extreme populations in the south and Saône regions shared the same summer heat and rainfall, but with colder winters in the mountains, as expected. *F. excelsior* control sites and Loire sites have intermediate temperatures between the Saône and *F. angustifolia* control sites, but they probably have dryer summers than both.

Discussion

Hybridization evidence

We present here strong evidence that hybridization has occurred among *F. excelsior* and *F. angustifolia* in Atlantic and Continental/Mediterranean France, but that introgression patterns are not the same for the hybrid zones of the Loire and Saône. Furthermore, we found that isolation between species appeared to be weak, and the gene pools detected for different sampling zones may be influenced by ecological conditions.

The first line of evidence for hybridization comes from the morphological differences between ash species (Fig. 2A, 2B) and the intermediate state of individuals in the Loire valley (Fig. 2D). Morphological separation regarding canonical variables was bimodal in both species, while individuals from the Loire could be considered as having a hybrid phenotype. Our results differ from those obtained on *Quercus robur* and *Q. petraea* (Kremer *et al.* 2002) where a constant bimodality of synthetic characters was found among several mixed populations that included putative hybrids. At a local level (St Dye in the Loire valley), we found evidence that intermediate morphological characters are significantly correlated with phenological patterns which may highlight hybrid individuals (Gerard *et al.* submitted). For example, trees with a series of *F. angustifolia* characters tended to flower early in winter, while individuals with a more *F. excelsior*-like morphology flowered later in spring, and intermediate ones flowered profusely in February. Whether this pattern holds for other hybrid populations needs to be verified, as hybrid segregation tends to produce mosaics of traits that may change from one hybrid zone to another (Rieseberg & Ellstrand 1993).

The morphological diversity found here was mainly due to a reduction in leaflet numbers and size *in F. angustifolia*, and consequently in total leaf surface area. This reduction in leaf area may be related to water use efficiency (*e.g.* Casper *et al.* 2001; Knight & Ackerly 2003), coping with leaf overheating (Bragg & Westoby 2002), and resistance to wind (*e.g.* Nikklas 1996), that may be particularly strong in the Mediterranean basin. Smaller leaves may be part of a suite of characters that also includes physiological responses, e.g. *F. angustifolia* depends more on mannitol and *F. excelsior* more on malate for stomata closure (Oddo *et al.* 2002). A genetic basis for smaller leaves is plausible, as green ash (*F. pennsylvanica*) seedlings in a common garden from a more xeric environment had smaller leaves, were more xerophitic and displayed higher net photosynthetic rates than seedlings from more mesic habitats (Abrams *et al.* 1990). We do not know, however, if *F. angustifolia* compensates for smaller leaflets with a larger number of leaves. Similarly, the abundance of large and numerous leaflets in many of the Saône individuals, may have originated from the need to equilibrate physiological processes in colder environments. In fact, common ashes growing in mountainous areas and on plains have been long differentiated by foresters and even receive different common names in the German language (see Marigo *et al.* 2000). Clearly, phenotypic plasticity plays a role in the physiological and morphological responses referred to here, and the genetic basis of these changes is still to be explored.

The abundance of intermediate phenotypes in the Loire region (Fig. 2D), where the weather is clearly intermediate (Fig. 5), suggests that both species may overcome their physiological limits, and inter-specific gene exchange would be likely in the region as both ashes can coexist. We observed the same morphological variation elsewhere, in a small 70 km transect, to the East of the Pyrenees in the Tech Valley, where *F. angustifolia* individuals thrive on riparian vegetation from sea level up to an altitude of 85 m. A narrow hybrid zone between this altitude and the beginning of the ecotonal piedmont at an altitude of about 110 m is rapidly replaced by *F. excelsior,* which increases its frequency up to an altitude of 1100 m (Dufour *et al.* pers. obs.). Thus, large scale latitudinal patterns of hybridization in these two ashes can be repeated at smaller scales when mountain ranges provide more rapid transitions among vegetation types.

The second line of evidence for hybridization arises from the presence of *F. angustifolia* gene pool elements in many of the Loire valley and in the Saône individuals. Many individuals from the Loire exhibited an *F. angustifolia*-like morphology (13%), with components of the narrow-leaved ash gene pool (59% on average). In the case of Saône individuals, the narrow-leaved ash gene pool was more concentrated in certain populations, where it constituted up to 50% of the local gene pool

(*e.g.* Conflandey), while only a few individuals resembled *F. angustifolia* (1%). However, the different morphological and marker introgression patterns may have had different origins, as discussed below.

Differential hybridization patterns, markers or history?

A first hypothesis to explain the different introgression patterns observed in the two hybrid zones may simply be marker resolution. If the microsatellites that we used during this study segregate independently of the genes controlling morphology (as seems to be the case) there is no reason for markers to follow the same geographical distribution as morphological traits. Allele-rich markers are efficient in detecting groups, especially if private alleles are present, as was the case in this study with the locus FEMSATL 19. However, genome wide screening is still required to detect gene interactions that may control morphological characters.

From an historical point of view, differential hybridization patterns may also indicate that the inter-specific gene flow is more ancient in the Loire than in the Saône region. The Loire conditions are intermediate (Fig. 5) and may even be milder since the riverbank rarely freezes, although the nearby plains experience frost (J Dufour, pers. obs.). In addition, the Loire delta has always been protected from freezing, even during glacial periods (Maupin 1993), which suggests that no climatic barrier has existed to southern colonizing communities. Since *F. angustifolia* is a riparian specialist (Marigo *et al.* 2000), it is possible that this southern group may have migrated freely, and several times, from the western Pyrenees up to the Loire. So there might have been enough time for *both* neutral alleles and morphological traits to introgress in the Loire, whereas in the Saône region, a hybridization process may only be in its initial stages. In fact, divergence estimates indicate that control populations and Saône populations are between four and five-fold more isolated than Loire and southern *F. angustifolia* populations. In view of the fact that permafrost completely covered the Saône region about 18,000 yr bp (Krebs *et al.* 2004) and that the Saône valley is sometimes only 20 km wide and surrounded by mountains displaying a continental climate, it is not unrealistic to suppose that migration might be difficult for *F. angustifolia*, a species adapted to warmer environments.

Geographical patterns of introgression in the Saône region appear to be more complex than those in the Loire. While the *F. angustifolia* gene pool is quite widespread in the Loire region, in the Saône valley, this gene pool is concentrated in populations from the north of our transect (Vernois)

and the south (Broye and Tavaux), resembling a mosaic of gene pools (Fig. 4). This patchy distribution of gene pools can be assigned to the more complex geography of the region, which may entail not only different migration patterns at a small scale, but also the possibility of a second source of *F. angustifolia.* The first source for the migration of *F. angustifolia* into the Saône region is very probably the Rhône River, which receives waters from the Saône and then drains directly into the Mediterranean Sea (Figure 1). Thus, contact between the *F. excelsior* arriving from the Southern Alps refuge, and *F. angustifolia* originating from Pyrenean populations is a likely scenario, as was proposed by Huntley & Birks (1983). A second, northern source of *F. angustifolia* could be explained by the fact that the Loire and the Seine rivers rise to the west of the Saône region, where elevations are low. As a consequence, the *F. angustifolia* gene pool that was already established in the Loire valley may take advantage of some mild protected lowlands, and arrive in Northern areas of the Saône. In fact, many species appear to have migrated from the west to the east, as the limits to post glacial colonization between Iberian groups and those from the east were the border between France, Germany and the Alps (Dumolin-Lapègue *et al.* 1998). For these reasons, independent origins for the narrow-leaved ash and hybrids in the Saône valley are possible.

Ecological correlations of gene pools

Because the detected gene pools were correlated with the ecological conditions prevailing at the sampling sites (and notably winter temperatures), the levels of inter-specific gene flow may also have been influenced by the environment. Two years of field observations in a highly introgressed population showed that *F. angustifolia*-like individuals that flower in early winter (Gerard *et al.* submitted), may lose their flowers to frost and produce no seed at all. However, a small fraction of trees flower again releasing pollen while the later flowering *F. excelsior* is in bloom, and thus generating the possibility of inter-specific gene flow. In Spain, *F. angustifolia* is known to require a minimum of chill to trigger flowering (Jato *et al.* 2004), so its flowering time and successful seed production may vary from year to year depending on winter conditions. Thus winter temperatures may not only constitute a physiological limit for *F. angustifolia*, but also impose demographic constraints on this species (*i.e.* risk of no seed production), and control the degree of inter-specific hybridization.

In the Saône region, we found that seeds from large, typical *F. excelsior* trees from Tavaux presented early germination without seed dormancy, like those in the hybrid population at St. Dye

(Gerard *et al.* in press), which was a clear sign of introgression. Seed dormancy with variable germination is usually interpreted as a bet hedging evolutionary strategy to deal with a variable environment (Forbis *et al.* 2002). For this reason, if dormancy release is one of the first physiological characters to introgress, *F. angustifolia* and its hybrids will have a demographic advantage in establishing populations if the climatic conditions become favorable and seed dormancy may no longer be advantageous. In this sense, hybridization will promote ecological invasion in the same way as the Californian species of *Carpobrotus* (Weber & D'Antonio 1999), in which hybrids appear to gain resistance against soil salinity and can survive in the native niche conditions.

In summary, we have shown that intermediate morphologies and gene pool components that can be attributed to *F. angustifolia* have been found in areas that are usually considered as providing natural conditions for distribution of the common ash. Our results call for a redefinition of the distribution of the narrow-leaved ash towards North-Western France, where the limits with *F. excelsior* appear to be weak. Indeed, our chosen common ash populations exhibited a non-negligible amount of the *F. angustifolia* gene pool and an overlapping morphology which implied that "pure" common ash may only be found further to the north. Furthermore, we have shown that hybridization processes do not follow the same patterns in the two studied regions, probably because of historic climatic conditions that have produced different isolation levels in Eastern and Western France. In the case of the Saône valley, where hybridization was only detected using nuclear markers, it is not known whether morphological introgression will also occur, if sufficient time is allowed. Future studies of large scale hybridization patterns of common and narrow-leaved ash populations should examine whether phenological isolation also varies across climatic gradients, whether a lack of dormancy is widespread in introgressed populations, and whether those characters have genetic-based responses.

References

Abrams MD, Kubiske ME, Steiner KC (1990) Drought adaptations and responses in five genotypes of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh.: photosynthesis, water relations and leaf morphology. *Tree Physiology*, **6**, 305-315.

Bilger I, Collin E, Vautrin MA (1995) Classement de peuplements porte-graines, et coordination du réseau de conservation des ressources génétiques forestières, Rapport CEMAGREF, France, 73 pp.

Brachet S, Jubier MF, Richard M, Jung-Muller B, Frascaria-Lacoste N (1999) Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*. *Molecular Ecology*, **8**, 160-163.

Bragg JG, Westoby M (2002) Leaf size and foraging for light in a sclerophyll woodland. *Functional Ecology*, **16**, 633–639.

Brewer S, Cheddadi R, de Beaulieu JL, Reille M (2002) The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management*, **156**, 27-48.

Casper BB, Forseth IN, Kempenich H, Seltzer S, Xavier K (2001) Drought prolongs leaf life span in the herbaceous desert perennial *Cryptantha flava. Functional Ecology*, **15**, 740-747.

Davis MB, Shaw RG (2001) Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science*, **292**, 673-679.

Dodd RS, Afzal-Rafii Z (2004) Selection and dispersal in a multispecies oak hybrid zone. *Evolution*, **58**, 261–269

Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Le Corree V, Petit RJ (1998) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European Continent. *Genetics*, **146**, 1475-1487.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–1587.

Forbis TA, Floyd SK, Queiroz A (2002) The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution*, **56**, 2112-2125.

Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995) An evaluation of genetic distances using microsatellite loci. *Genetics*, **139**, 463–471.

Heuertz M, Hausman JF, Tsvetkov I, Frascaria-Lacoste N, Vekemans X (2001) Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Molecular Ecology*, **10**, 1615–1623.

Heuertz M, Hausman JF, Hardy OJ *et al.* (2004a) Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, **58**, 976–988.

Heuertz M, Fineschi S, Anzidei M *et al.* (2004b) Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology*, **13**, 3437–3452.

Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. *Series B, Biological Sciences*, **359,** 183–195.

Huntley B, Birks HJB (1983) *An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe: 0–13 000 Years Ago*. Cambridge University Press, Cambridge.

Jato V, Rodriguez-Rajo FJ, Dacosta N, Aira MJ (2004) Heat and chill requirements of *Fraxinus* flowering in Galicia (NW Spain). *Grana*, **43**, 217-223.

Jeandroz S, Frascaria-Lacoste N, Bousquet J (1996) Molecular recognition of the closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla* (Oleaceae) by RAPD markers. *Forest Genetics*, **3**, 237-242.

Jeandroz S, Roy A, Bousquet J (1997) Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus *Fraxinus* (Oleaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, 241-251.

Knight CA, Ackerly DD (2003) Evolution and plasticity of photosynthetic thermal tolerance, specific leaf area and leaf size: congeneric species from desert and coastal environments. *New Phytologist*, **160**, 337-347.

Krebs P, Conedera M, Pradella M *et al.* (2004) Quaternary refugia of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.): an extended palynological approach. *Vegetation History and Archaeobotany*, **13**, 145–160.

Kremer A, Dupouey JL, Deans JD, *et al.* (2002) Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. *Annals of Forest Science*, **59**, 777-787.

Lefort F, Brachet S, Frascaria-Lacoste N, Edwards KJ, Douglas GC (1999) Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the Olives family. *Molecular Ecology*, **8**, 1088-1090.

Levin DA (2003a) Ecological speciation: lessons from invasive species. *Systematic Botany,* **28**, 643–650.

Levin DA (2003b) The ecological transition in speciation. *New Phytologist,* **161**, 91–96.

Maupin C (1993) Micropaleontology and paleogeography of the Saint-Jean-de-Monts Oligocene basin (Southern-Armorican massif, France). *Geobios*, **26**, 267-278.

Marigo G, Peltier JP, Girel J, Pautou G (2000) Success in the demographic expansion of *Fraxinus excelsior* L. *Trees*, **15**, 1-13.

Monasterio M, Sarmiento L (1991). Adaptive radiation of *Espeletia* in the cold Andean tropics. *Trends in Ecology and Evolution,* **6**, 387–391.

Morand ME, Brachet S, Rossignol P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N (2002) A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology*, **11**, 377-385.

Morand-Prieur ME, Vedel F, Raquin C *et al.* (2002) Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. *Molecular Ecology*, **11**, 613-617.

Niklas, KJ (1996) Differences between *Acer saccharum* leaves from open and wind-protected sites. *Annals of Botany*, **78**, 61–66.

Oddo E, Saiano F, Alonzo G, Bellini E (2002) An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the Oleaceae growing in Northern Sicily. *Annals of Botany*, **90**, 239-243.

Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL *et al.* (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300,** 1563-1563.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.

Rameau JC, Mansion D, Dumé G (1989) *Flore forestière Française, guide écologique illustré. Tome I. Plaines et Collines*. Institut pour le Développement Forestier, Paris.

Raquin C, Brachet S, Jeandroz S, Vedel F, Frascaria-Lacoste N (2002) Combined analyses of microsatellite and RAPD marks demonstrate possible hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Forest Genetics*, **9**, 111-114.

Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.

Rieseberg LH, Ellstrand NC (1993) What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Science,* **12**, 213–24.

Soranzo N, Alia R, Provan J, Powell W (2000) Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provide new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology*, **9**, 1205-1211.

Wallander E, Albert VA (2000) Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trn*L-*F* sequence data. *American Journal of Botany*, **87**, 1827-1841.

Warlde P (1961) Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Ecology*, **49,** 739-751.

Weber E, D'Antonio CM (1999) Germination and growth responses of hybridizing *Carpobrotus* species (Aisoaceaea) from Coastal California to soil salinity. *American Journal of Botany,* **86,** 1257-1263.

Williams JW, Shuman BN, Webb III T, Bartlein PJ, Leduc PL (2004) Late-Quaternary vegetation dynamics in North America: scaling from taxa to biomes. *Ecological Monographs*, **74,** 309–334.

Acknowledgements

The authors would like to thank the comments by ME Morand, AL Caicedo, JA Shykoff, Alex Widmer and the anonymous reviewers that greatly improved the quality of the manuscript. JFFM was supported by the European research contract *RAP*- QLK5-2001-00631 as part of a postdoctoral position at the Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, Paris XI. French Ministry of Agriculture (DGFAR) also provided funds for this study. We would also like to thank I Bilger (CEMAGREF) for her aid in population sampling, and P Bertolino and L Nowak for their very useful aid in the laboratory and field collections.

Author Information box

Juan Fernandez-Manjarrés research interests include the study of the genetic structure of tropical and temperate tree species at the local and population level, focusing in mating systems. At the moment, he collaborates with the Forest genetics group at Orsay examining the genetic basis of phenological responses in European ashes. Pierre Gérard is a doctoral student at the same laboratory whose interests lie in the study of fine scale mechanisms of reproductive isolation. Jean Dufour participates actively in the collection and evaluation of French and European timber species provenances. Christian Raquin interests are the physiology of seed germination and micro propagation processes in Ash and related species. Nathalie Frascaria-Lacoste coordinates the research group on Ashes at Orsay whose overall objectives are to determine the genetic structure, gene flow and adaptive variation in *Fraxinus* species.

Figure legends

Fig. 1 Sampling sites in France for large scale *F. excelsior* and *F. angustifolia* hybridization analysis. Populations 1 through 15 represent the Saône locations, 16 to 25 the Loire sites, populations 26 through 29 with asterisks (*) represent well known *F. excelsior* populations, and populations 30 to 34 *F. angustifolia* controls.

Fig. 2 Frequency histograms for the first canonical variable (Can1) of the morphological features of (A) control populations of *F. excelsior* (mean = 0.36, SD = 0.19); (B) control populations of *F. angustifolia* (mean = -2.68, SD = 0.81); (C) Loire valley populations (mean = -0.7393, SD = 1.02); and, (D) Saône valley populations (mean = 1.16, SD = 1.33).

Fig. 3 Histogram of the average composition of gene pools found in each individual in control populations and putative hybrid zones. Black color corresponds to the *F. angustifolia* gene pool (ang), grey color correspond to *F. excelsior* gene pool 1 (exc1), and white color represent the common ash gene pool 2 (exc2).

Fig. 4 Dispersion graph of morphological characteristics of each individual as represented by its first canonical variable (Can1), and the probability of pertaining to the *F. angustifolia* gene pool (ang). A. Control populations represented with red triangles for *F. angustifolia* and blue circles for *F. excelsior*; B. Putative hybrid individuals from the Saône region (squares); and, C. Putative hybrid individuals from the Loire (diamonds). Control populations were left in light shading to facilitate comparison with putative hybrid zones.

Fig. 5 Principal components of climatic data from the 34 sampled populations. Climatic data originated from the closest available weather center, and more than one field station could be assigned to the same weather station. Dots (**.**) represent the Saône valley stations, stars (*****) represent the *F. excelsior* control populations, circles (**o**) represent Loire valley stations, and triangles (▲) represent south eastern *F. angustifolia* stations. It is evident that the Loire valley climate is intermediate between the north eastern planes of France and the south, although closer to the former.

Table 1 Sampling zone, population name, number of individuals sampled per population, geographical position (Lambert coordinates with origin 46.8°N, 2.3°E in hundreds of m), for 34 populations of *Fraxinus* spp. collected between 2002 and 2004 in continental France.

Region/Population type	Population number	Population name	*n*	X	Y	Altitude
Saône	1	Vernois-sur-Mance	27	8580	23219	230
	2	Conflandey	30	8778	23097	260
	3	Marchaux	27	8869	22652	345
	4	Vaux-le-Moncelot	30	8685	22808	240
	5	Amancey	30	8838	22332	500
	6	Breres	30	8675	22348	260
	7	Paroy	26	8691	22331	430
	8	Losne	21	8221	22373	180
	9	Rigny	30	8485	22800	190
	10	Onay	30	8529	22705	235
	11	Soing-Cubry-Charentenay	30	8663	22932	240
	12	Autet	30	8527	22881	190
	13	Broye	30	8738	23040	185
	14	Morschwiller	20	9695	23157	270
	15	Tavaux	20	8330	22305	190
Loire	16	Thouaré-sur-Loire	28	3141	22587	50
	17	La Chapelle-sur-Loire	25	4399	22521	50
	18	Seiches-sur-le Loir	20	3970	22899	50
	19	St Pryvé-Saint-Mesmin	23	5650	23204	50
	20	Montjean-sur-Loire	30	3586	22702	50
	21	Saint-Dye-sur-Loire	28	5362	22955	50
	22	Noizay	24	4910	22701	50
	23	Saumur 1	25	4173	22536	50
	24	Saumur 2	25	4173	22536	50
	25	Avaray	20	5420	23028	50
North Central	26	Dourdan	30	5760	23922	135
*F. excelsior**	27	La Romagne	20	7427	25222	175
	28	St Martin d'Ablois	20	7119	24472	240
	29	St Gobain	20	6752	25114	80
South	30	Mas Larrieu	24	6564	17064	0
*F .angustifolia**	31	Grabels	24	6919	18215	30
	32	Cuxac d'Aude	24	6209	16839	12
	33	Cazouls les Beziers	24	6606	16942	20
	34	Boujan sur Libron	24	6653	18033	50

* control populations for each species.

Table 2 Canonical discriminant analysis (CDA): summary tables.

A) Canonical discriminant Analysis

	Canonical Correlation	Standard Error	Eigenvalue	Proportion	Cumulative	Likelihood Ratio	*F* Value	*p* > *F*
1	0.827877	0.010810	1.7111	0.7129	0.7129	0.14555408	7.80	<.0001
2	0.564348	0.023417	0.2979	0.1529	0.8659	0.46263618	3.48	<.0001
3	0.380646	0.029382	0.0538	0.0555	0.9213	0.67883830	2.11	<.0001
4	0.321996	0.030798	0.0416	0.0379	0.9592	0.79386203	1.61	<.0001
5	0.262694	0.031989	0.0366	0.0243	0.9834	0.88569152	1.16	0.1558
6	0.190172	0.033118	0.0244	0.0123	0.9957	0.95134160	0.73	0.9303
7	0.113849	0.033915	0.0131	0.0043	1.0000	0.98703836	0.40	0.9977
8	0.000000	0.034360	0.0000	1.0000	-	1.00000000	-	-

B) Correlation of Canonical Variables

Variable[1]	Can1	Can2	Can3
min_leaflet	0.906234	-0.207023	0.098778
max_leaflet	0.643300	-0.055804	0.395181
av_leaflet	0.824611	-0.145842	0.241567
length	0.575942	0.605877	-0.218054
width	0.637737	0.612560	0.231445
arcsin_rwl	0.284274	0.186077	0.560892
leaflet_area	0.642216	0.680082	-0.037959
total_leaf_area	0.768012	0.594028	0.002245

[1]Variable names correspond to: *min_leaflet* = minimum number of leaflets per tree, *max_leaflet* = maximum number of leaflets per tree; *av_leaflet* = average number of leaflets per tree, *length* = second leaflet length, *width* = second leaflet width, *arcsin_rwl* = second leaflet arcsine of the width/length ratio, *leaflet_area* = second leaflet length x with product, and *total_leaf_area* = second leaflet area times the average number of leaflets per tree.

Table 3 Overall genetic variation at five nuclear microsatellite loci in the two transects examined in Central France for *F. excelsior* populations, potential hybrid populations, and *F. angustifolia* control populations. SD represents the standard deviations of the average for five loci.

Zone	*A*	A_e	H_o	H_e	*f*
Saône	56.2	17.3	0.73	0.89	0.19
	10.9	10.6	0.19	0.12	0.13
Loire	33.6	12.6	0.77	0.87	0.13
	13.7	8.8	0.18	0.10	0.12
F. excelsior	37	18.3	0.78	0.92	0.15
	8.9	10.3	0.08	0.06	0.06
F. angustifolia	24	10.5	0.76	0.83	0.09
	13.0	8.5	0.21	0.17	0.11

Table 4 Pairwise genetic structure (F_{st}) of the populations analyzed, including regions and species, and of control populations. The lowest values for genetic structure were among the Loire and the *F. angustifolia* populations, and the highest values were among the Loire valley and Saône populations. All F_{st} values are significantly greater than zero, except between the Loire and *F. angustifolia* from the south.

	Saône	Loire	*F. angustifolia*
F. excelsior	0.038 / [1]0.3288***	0.037 / 0.2141*	0.037 / 0.6957***
Saône	-	0.045 / 0.3896***	0.043 / 0.4697***
Loire		-	0.028 / 0.1755 *n.s.*

[1]The second number in each entry represents the correlation of the pairwise regression analysis of genetic and geographical distances (IBD). The asterisks represent the level of significance of the correlation after 1000 permutations of the distance and genetic matrices of a Mantel test (*** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$).

Table 5 Ecological correlates of the genetic groups found for common ash, narrow-leaved ash and putative hybrid populations in France, calculated using CCA.

A) Canonical Correlation Analysis

	Canonical Correlation	Standard Error	Eigenvalue	Proportion	Cumulative	Likelihood Ratio	*F* Value	$p > F$
1	0.887664	0.036914	3.7158	0.7884	0.7884	0.0960	3.49	<.0001
2	0.639461	0.102895	0.6918	0.1468	0.9352	0.4527	1.67	0.0952
3	0.483796	0.133333	0.3056	0.0648	1.0000	0.7659	1.27	0.3050

B) Correlation of Canonical Variables

Correlations Between Genetic Variables and their Canonical Variables			
	Genetic variable 1	Genetic variable 2	Genetic variable 3
ang	-0.8871	0.0218	-0.0053
exc1	0.4773	0.5086	0.1352
exc2	0.5450	-0.4807	-0.1165

Correlations Between Ecological Variables and their Canonical Variables			
	Ecological variable 1	Ecological variable 2	Ecological variable 3
X (longitude)	0.6543	0.1027	-0.1282
Y(latitude)	0.5716	0.0797	0.2780
Altitude	0.7967	-0.2392	-0.0002
Precipitation	0.6022	-0.0921	-0.0298
Frost days	0.7263	0.1660	0.1678
Temperature January	-0.8288	-0.1331	-0.1159
Temperature July	-0.5979	-0.1267	-0.2523
Mean Temperature	-0.7612	-0.1104	-0.2030

Figure 1

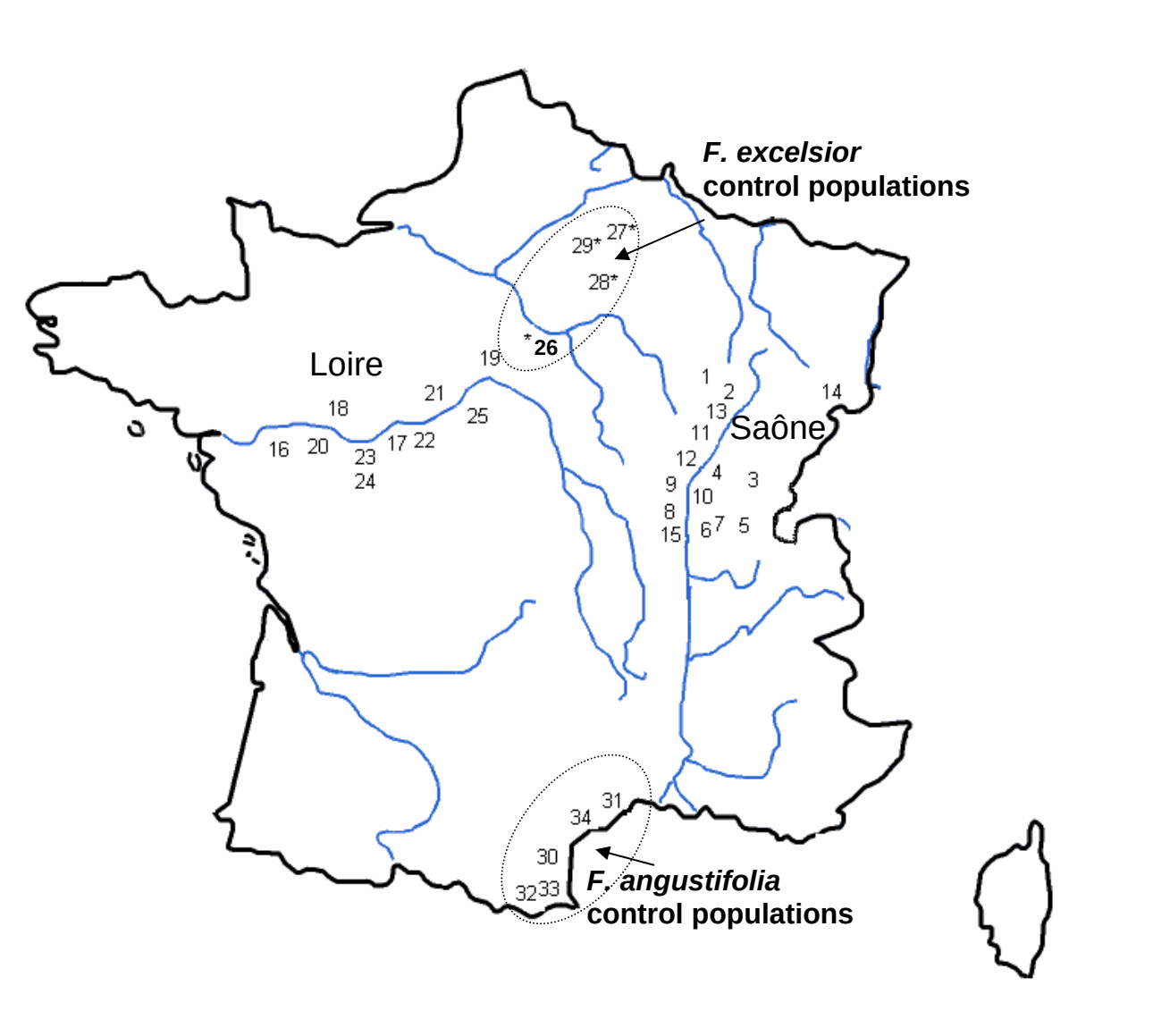

F. excelsior
control populations
29* 27*
28*
*26
19
Loire
18
21
25
16 20 23 24
17 22
1
2
13
14
11
Saône
12
4
3
9
10
8
15
6 7 5
31
34
30
32 33
F. angustifolia
control populations

Figure 2

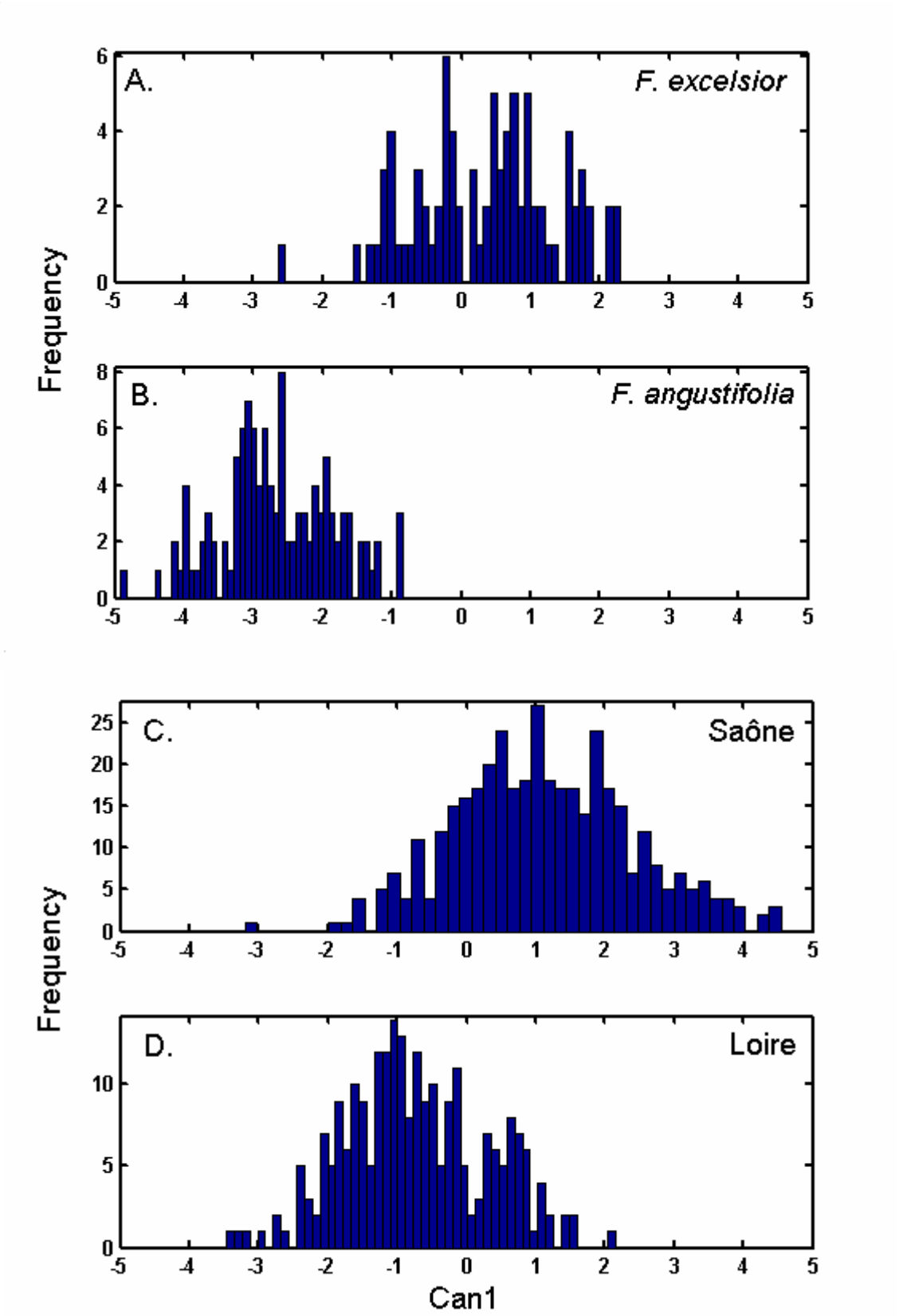

A.
F. excelsior
B.
F. angustifolia
C.
Saône
D.
Loire
Frequency
Frequency
Can1

Figure 3

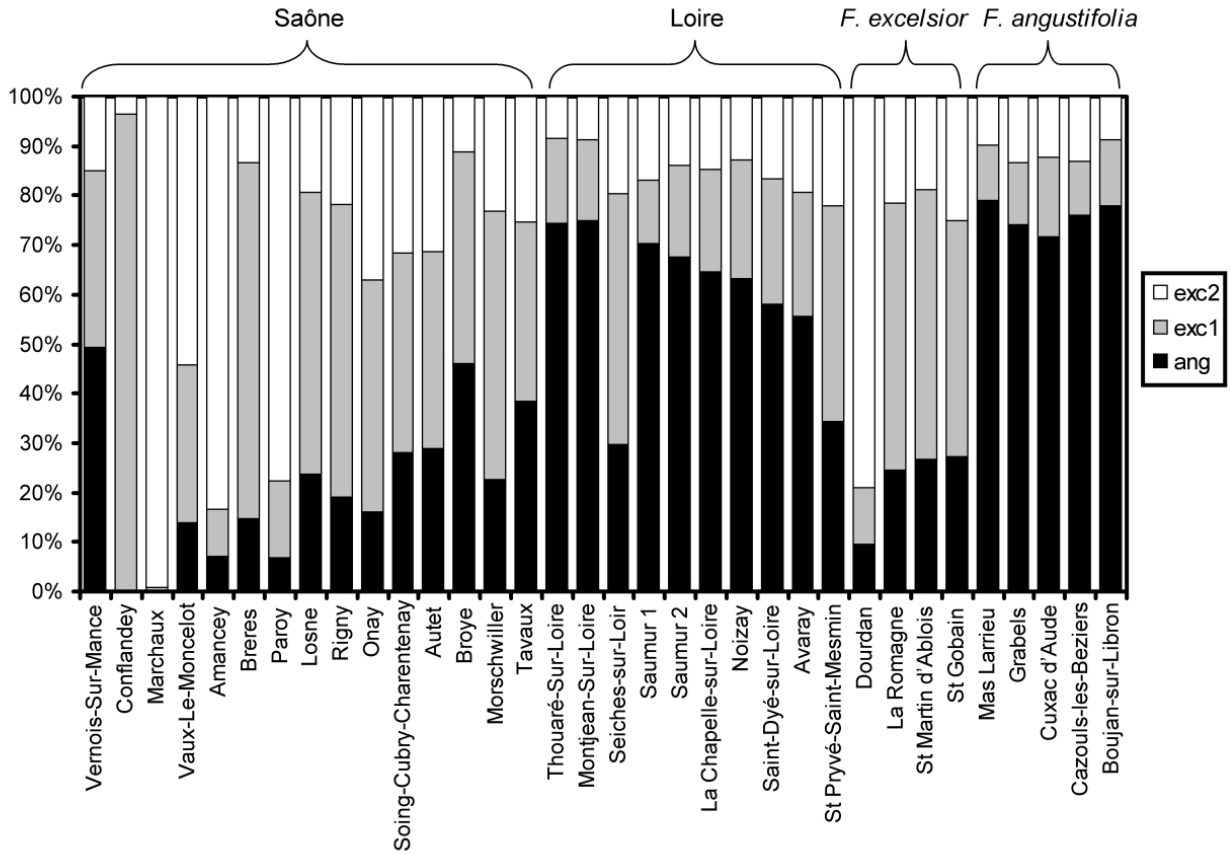

Saône
Loire
F. excelsior
F. angustifolia
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
exc2
exc1
ang
Vernois-Sur-Mance
Conflandey
Marchaux
Vaux-Le-Moncelot
Amancey
Breres
Paroy
Losne
Rigny
Onay
Soing-Cubry-Charentenay
Autet
Broye
Morschwiller
Tavaux
Thouaré-Sur-Loire
Montjean-Sur-Loire
Seiches-sur-Loir
Saumur 1
Saumur 2
La Chapelle-sur-Loire
Noizay
Saint-Dyé-sur-Loire
Avaray
St Pryvé-Saint-Mesmin
Dourdan
La Romagne
St Martin d'Ablois
St Gobain
Mas Larrieu
Grabels
Cuxac d'Aude
Cazouls-les-Beziers
Boujan-sur-Libron

Figure 4

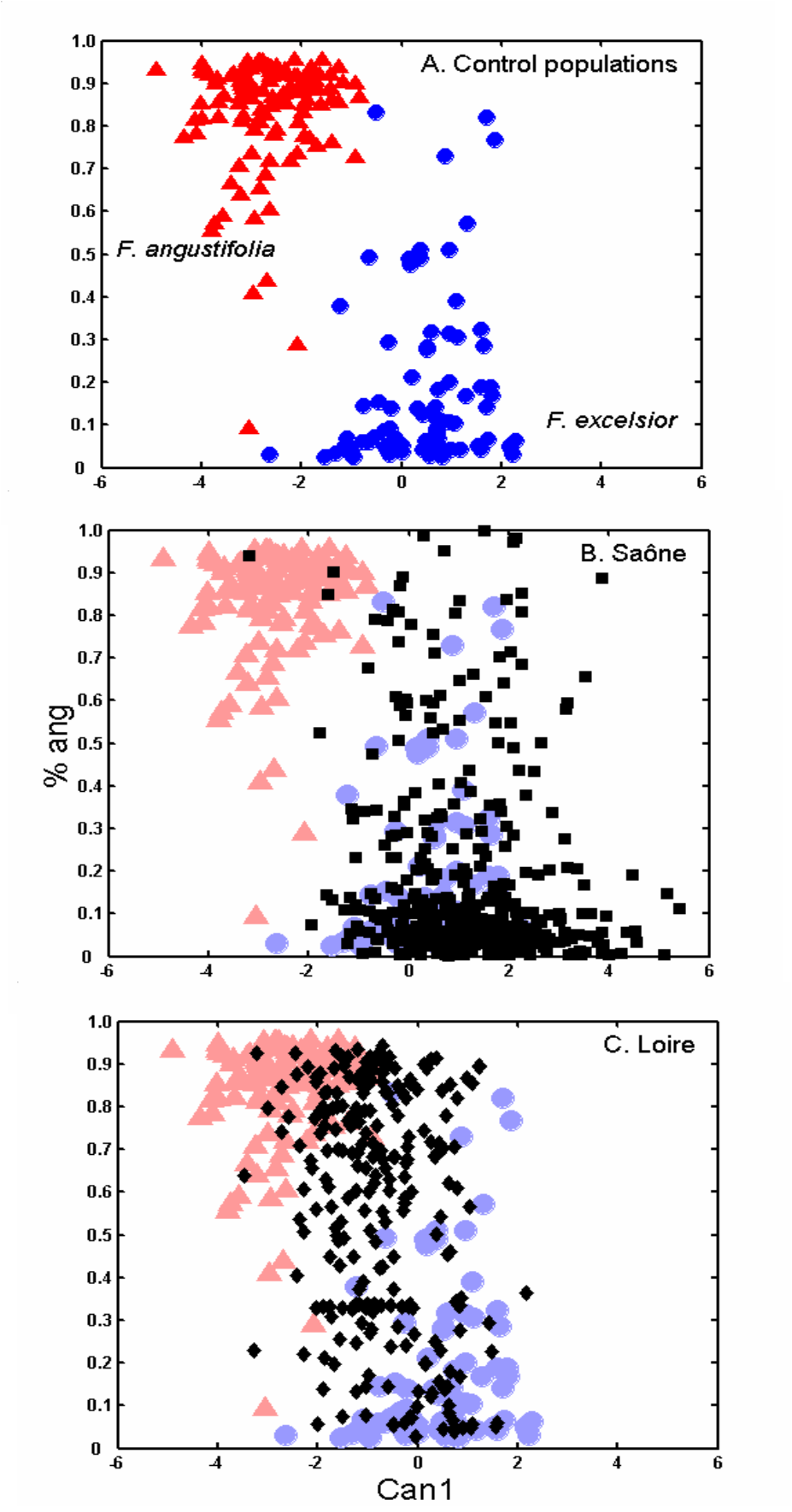
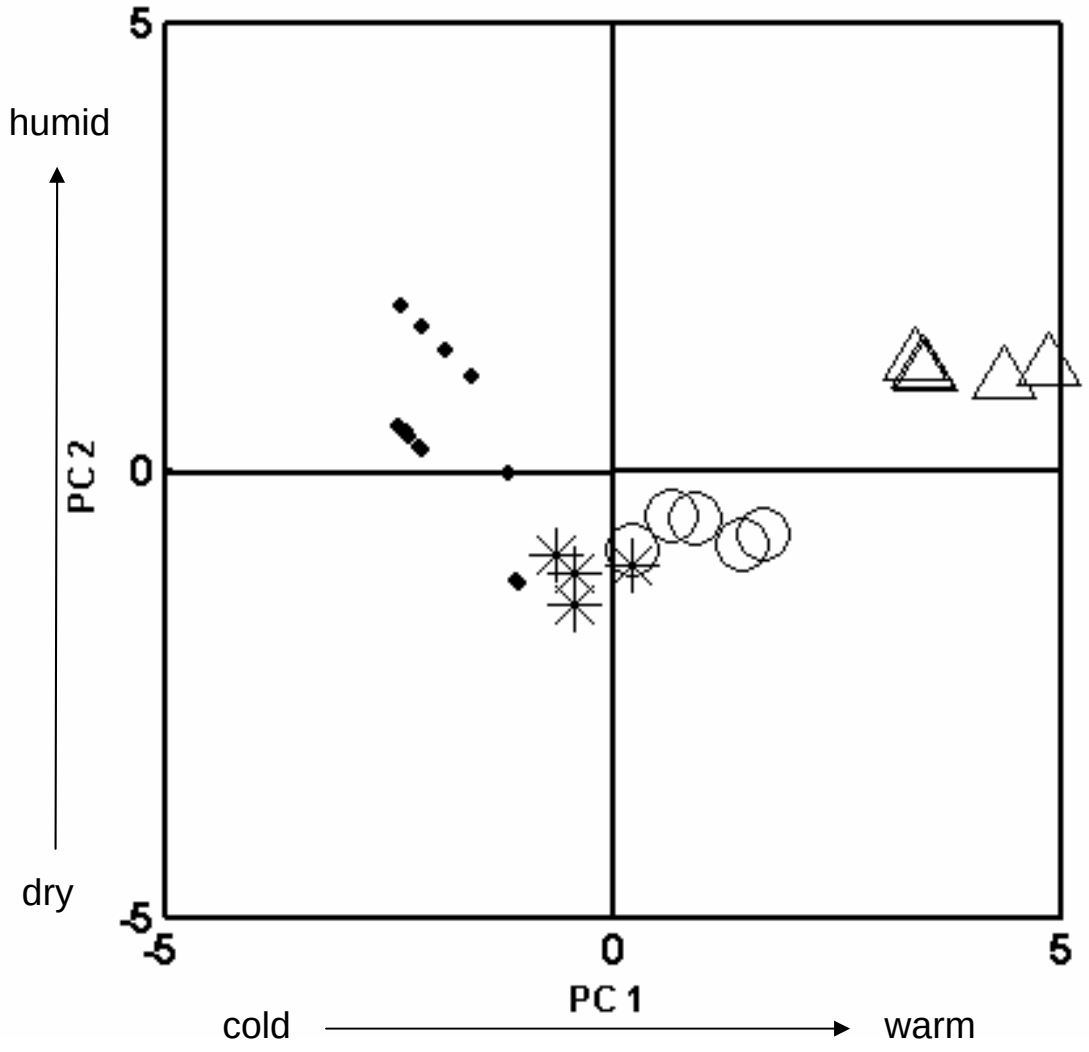

A. Control populations
F. angustifolia
F. excelsior
B. Saône
C. Loire
% ang
Can1

Figure 5



Online Supplementary material

Table 1. Summary of morphological variation for the analyzed populations in Central France.

id	Population name	Min_leaflet[1]	Max_leaflet	length	width	arcsin_rwl
1	**Vernois-sur-Mance**	11.15 (1.46, 9-13)	12.11 (1.4, 9-15)	90.85 (13.87, 52-122)	32.89 (7.5, 21-53)	0.36 (0.06, 0.27-0.49)
2	**Conflandey**	10.64 (1.34, 7-13)	11.57 (1.32, 9-13)	95.86 (15.06, 70-122)	31.43 (6.06, 20-44)	0.33 (0.05, 0.24-0.46)
3	**Marchaux**	9.7 (1.55, 7-13)	11.43 (1.34, 9-13)	87.96 (15.13, 50-112)	31.17 (6.37, 23-47)	0.36 (0.05, 0.3-0.46)
4	**Vaux-le-Moncelot**	10.48 (1.31, 9-13)	11.59 (1.55, 9-15)	83.04 (14.44, 60-108)	28.41 (6.24, 18-46)	0.34 (0.07, 0.23-0.51)
5	**Amancey**	10.66 (1.7, 7-15)	12.45 (1.3, 11-15)	90.24 (12.54, 60-118)	30.72 (5.5, 21-40)	0.34 (0.07, 0.24-0.49)
6	**Breres**	10.8 (1.32, 9-13)	12.2 (1.35, 9-15)	99.53 (14.17, 75-135)	35.63 (7.21, 23-51)	0.36 (0.07, 0.25-0.5)
7	**Paroy**	10.62 (0.8, 9-11)	11.69 (1.12, 9-13)	95.62 (15.55, 60-124)	30.85 (6.43, 20-51)	0.33 (0.06, 0.21-0.44)
8	**Losne**	9.95 (1.2, 9-13)	11.86 (1.35, 9-15)	73.57 (13.47, 55-110)	27.48 (5.53, 19-37)	0.38 (0.07, 0.28-0.54)
9	**Rigny**	9.67 (1.69, 7-13)	11.53 (1.81, 9-15)	72.6 (10.75, 49-92)	24.37 (4.67, 16-36)	0.34 (0.08, 0.21-0.53)
10	**Onay**	10.4 (1.5, 7-13)	11.2 (1.1, 9-13)	86.47 (14.96, 63-131)	29.6 (5.31, 19-45)	0.35 (0.06, 0.23-0.47)
11	**Soing-Cubry-Charentenay**	10.6 (1.43, 9-15)	11.6 (1.67, 9-17)	90.73 (18.37, 56-141)	29.6 (7.96, 18-55)	0.33 (0.06, 0.23-0.46)
12	**Autet**	10.53 (1.8, 7-15)	11.8 (1.54, 9-15)	81.7 (14.42, 59-111)	29.43 (7.02, 17-46)	0.36 (0.08, 0.24-0.56)
13	**Broye**	9.29 (1.7, 7-13)	11.14 (1.63, 9-15)	73.71 (10.38, 54-97)	24.29 (4.93, 12-33)	0.33 (0.06, 0.16-0.48)
14	**Morschwiller**	10.78 (1.17, 9-13)	11.78 (1.22, 11-15)	76.44 (12.88, 55-95)	23.28 (5.55, 12-32)	0.3 (0.06, 0.22-0.4)
15	**Tavaux**	10.78 (1.8, 7-15)	12 (1.41, 9-15)	64.5 (11.09, 52-95)	19 (3.12, 11-25)	0.3 (0.07, 0.2-0.45)
16	**Thouaré-sur-Loire**	7.07 (1.27, 5-9)	9.21 (1.47, 7-11)	78.25 (12.98, 59-112)	22.21 (4.02, 13-31)	0.29 (0.05, 0.18-0.42)
17	**La Chapelle-sur-Loire**	7.88 (2.32, 5-13)	9.96 (2.17, 7-15)	68.36 (12.85, 47-96)	22.04 (4.41, 14-31)	0.33 (0.06, 0.23-0.5)
18	**Seiches-sur-le Loir**	10.05 (1.39, 7-13)	12.37 (1.64, 9-15)	77 (13.94, 51-100)	31.63 (7.99, 13-45)	0.42 (0.1, 0.18-0.55)
19	**St Pryvé-Saint-Mesmin**	9.7 (1.15, 7-11)	11.52 (1.24, 9-13)	75.7 (10.54, 56-96)	32.09 (16.31, 19-81)	0.43 (0.22, 0.26-1.14)
20	**Montjean-sur-Loire**	7.67 (1.92, 5-11)	9.6 (1.75, 7-13)	70.33 (12.19, 51-96)	20.8 (4.02, 12-28)	0.3 (0.07, 0.18-0.49)
21	**Saint-Dye-sur-Loire**	8.57 (1.91, 5-11)	10.79 (1.66, 7-13)	75.43 (12.44, 55-102)	23.18 (5.84, 13-41)	0.31 (0.07, 0.21-0.44)
22	**Noizay**	7.67 (2.18, 5-11)	9.58 (2.32, 5-13)	79.13 (12.93, 55-101)	26.5 (7.4, 15-45)	0.34 (0.08, 0.19-0.5)
23	**Saumur 1**	7.24 (2.03, 3-11)	9.88 (2.09, 7-13)	69.32 (11.96, 45-98)	20.56 (5.35, 11-36)	0.3 (0.05, 0.16-0.39)
24	**Saumur 2**	8.12 (1.74, 5-11)	10.2 (2, 7-15)	73.12 (8.46, 60-93)	20.56 (3.43, 14-30)	0.29 (0.05, 0.2-0.41)
25	**Avaray**	8.6 (1.9, 7-13)	11.1 (2, 9-15)	72 (8.6, 55-83)	21.95 (4.16, 15-30)	0.31 (0.06, 0.2-0.45)
26	**Dourdan**	9.13 (1.48, 7-13)	11.73 (1.11, 9-13)	77.73 (14.17, 55-115)	25.17 (5.36, 16-35)	0.33 (0.07, 0.21-0.5)
27	**La Romagne**	10.5 (1.57, 7-13)	11.2 (1.28, 9-13)	69.85 (12.77, 50-90)	23.2 (5.63, 14-33)	0.33 (0.08, 0.18-0.5)
28	**St Martin d'Ablois**	11.22 (1.66, 7-13)	12 (1.24, 11-15)	74.17 (14.02, 50-100)	23.06 (5.72, 15-37)	0.33 (0.11, 0.21-0.62)
29	**St Gobain**	10.9 (1.65, 7-13)	11.6 (1.31, 9-13)	72.45 (12.99, 55-95)	24 (5.61, 15-35)	0.33 (0.09, 0.21-0.55)
30	**Mas Larrieu**	5 (1.56, 3-7)	8.92 (1.72, 5-13)	69.04 (14.56, 46-104)	20.42 (4.55, 11-30)	0.3 (0.07, 0.18-0.51)
31	**Grabels**	5.67 (1.74, 3-9)	9 (2.21, 5-13)	60.33 (7.84, 46-71)	19 (4.11, 13-28)	0.31 (0.05, 0.19-0.41)
32	**Cuxac d'Aude**	4.75 (1.48, 3-7)	8.5 (2.06, 5-13)	69.08 (12.36, 50-106)	20.38 (3.93, 13-30)	0.3 (0.06, 0.19-0.43)
33	**Cazouls les Beziers**	5.33 (1.74, 3-9)	8.5 (2.3, 5-13)	62.83 (6.85, 52-82)	19.33 (4.82, 10-33)	0.31 (0.06, 0.16-0.42)
34	**Boujan sur Libron**	5.75 (1.85, 3-9)	9.33 (2.33, 5-13)	70.96 (14.26, 48-100)	20.58 (3.5, 15-28)	0.3 (0.07, 0.19-0.46)

[1]Variable names correspond to: *min_leaflet* = minimum number of leaflets per tree, *max_leaflet* = maximum number of leaflets per tree, *length* = second leaflet length, *width* = second leaflet width, *arcsin_rwl* = second leaflet arcsine of the width/length ratio.

Table 2. Morphological analyses on *Fraxinus* spp. populations. *F* corresponds to Fisher's *F* test for the complete model, *p* corresponds to the overall significance, R^2 indicates the proportion of variation explained, *p zones* the significance value of the type I squares error for groups, and the last two columns represent the *p* value of the type III sum of squares error for populations and diameter at breast height (DBH) respectively.

Variable	*F*	*p*	R^2	*p Zones*	*p* pop	*p* DBH
Minimum number of leaflets	20.55	0.0001	0.46	0.0001	0.0001	0.1554
Maximum number of leaflets	6.71	0.0001	0.22	0.0001	0.0001	0.4166
Average number of leaflets	12.97	0.0001	0.35	0.0001	0.0001	0.2516
Length	10.59	0.0001	0.30	0.0001	0.0001	0.1141
Width	11.67	0.0001	0.32	0.0001	0.0001	0.1141
Arcsin (width/length)	2.99	0.0001	0.11	0.0002	0.0001	0.4052
Leaflet area	17.63	0.0001	0.42	0.0001	0.0001	0.2559
Leaf area	24.85	0.0001	0.51	0.0001	0.0001	0.7421

Discussion

Nous avons pu mettre en évidence différentes zones d'hybridation, qui diffèrent complètement dans leur structure génétique et morphologique. L'histoire et l'origine de ces zones a du être totalement différente, et ici une étude phylogéographique sur des populations de *F. angustifolia* européennes aurait été très utile à la compréhension des *patterns* observés. Cependant, il est intéressant de noter que le marqueur microsatellite chloroplastique discriminant testé sur les croisements contrôlés (Morand-Prieur et al. 2002) a montré des distributions plus que suspectes au sein des populations de zones hybrides. En Val de Loire, aucun polymorphisme n'a été détecté, seul l'allèle « *F. excelsior* » était présent, alors que les variations morphologiques et les fréquences alléliques aux loci microsatellites ont montré une large représentation de *F. angustifolia*. En Vallée de Saône, l'allèle « *F. angustifolia* » était très largement majoritaire, alors que les microsatellites et la morphologie ont montré l'inverse (Fernandez-Manjarrés et Gérard, résultats non publiés). Ces résultats pourraient indiquer une direction de flux de gènes différente dans les deux régions (*F. angustifolia* vers *F. excelsior* en Val de Loire) mais cela semble peu probable étant donné l'importante représentation de *F. angustifolia*. D'autre part, le séquençage de ce marqueur sur un échantillon de 50 individus environ a révélé un polymorphisme de type SNP à plusieurs endroits dans la séquence (Fernandez-Manjarrés et Gérard, résultats non publiés), et l'existence d'indels. Il pourrait s'agir donc plus probablement d'un polymorphisme ancestral partagé (comme cela pourrait être le cas chez les chênes [Muir & Schlötterer 2004]), avec par ailleurs des contraintes de taille de séquence qui générerait de l'homoplasie.

L'existence de deux pools génétiques différents attribués à *F. excelsior* est pour le moins surprenant. La Vallée de Saône étant située à proximité d'une zone de suture (Taberlet et al. 1998; Hewitt 1999), il est possible que ces deux pools génétiques correspondent à deux lignées ayant recolonisé l'Europe depuis des refuges différents. Si les populations de *F. excelsior* du centre de l'Europe sont peu différenciées pour les marqueurs microsatellites, celles du sud de l'Europe sont très structurées (Heuertz et al. 2004). La Saône pourrait être un point de rencontre non seulement de *F. excelsior* et *F. angustifolia* mais peut-être également de plusieurs lignées de *F. excelsior.*

La progression de *F. angustifolia* semble limitée par les conditions climatiques plus rudes en Vallée de Saône, et il serait intéressant de prolonger le transect jusqu'à la Méditerranée par la Vallée du Rhône : la basse Vallée de Saône est peut être la limite vers le Nord de sa distribution. La Val de Loire s'est avérée être la région appropriée pour étudier les flux de

gènes et les régimes de reproduction à échelle locale. Cette zone n'a pas exactement une structure clinale, même si les populations de bordure (Thouaré à l'embouchure et St-Pryvé près d'Orléans) sont les plus extrêmes génétiquement et morphologiquement. Par exemple, St-Dyé qui est proche d'Orléans montre des fréquences alléliques et des *patterns* morphologiques majoritairement typiques de *F. angustifolia*, et Seiches non loin de l'embouchure montre des patterns morphologiques majoritairement typiques de *F. excelsior*.

RÉFÉRENCES

Heuertz, M., J. F. Hausman, O. J. Hardy, G. G. Vendramin, N. Frascaria-Lacoste & X. Vekemans. 2004. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern european populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Evolution 58:976-988.

Hewitt, G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. Biol. J. Linn. Soc. 68:87-112.

Morand-Prieur, M.-E., F. Vedel, C. Raquin, S. Brachet, D. Sihachakr & N. Frascaria-Lacoste. 2002. Maternal inheritance of a chloroplast microsatellite marker in controlled hybrids between *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus angustifolia*. Mol. Ecol. 11:613-617.

Muir, G. & C. Schlötterer. 2004. Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). Mol. Ecol. 14:549-561.

Picard, J.-F. 1983. A propos du frêne oxyphylle, *Fraxinus angustifolia* Vahl. Forêt-Entreprise 83:2-4.

Taberlet, P., L. Fumagalli, A.-G. Wust-Saucy & J.-F. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Mol. Ecol. 7:453-464.

CHAPITRE 3

PHENOLOGIE FLORALE ET FLUX DE GENES

L'étude intensive des flux de gènes et de l'isolement reproducteur à échelle locale a donc été réalisée en Val de Loire, à Saint-Dyé-sur-Loire, port de Chambord [Saint-Dyé connut son plus bel essor sous le règne de François Ier, lors de la construction du château de Chambord, suite à l'abandon du projet de détournement de la Loire. Le port était utilisé pour débarquer tous les matériaux de constructions provenant du Val de Loire ou du Cher]. La population de Saint-Dyé est un peuplement quasiment pur de frênes, où la variabilité morphologique est très grande. Etant données les dates de floraison des deux espèces, la première partie de ces travaux consistait à déterminer si la phénologie florale avait une influence sur la structure génétique et morphologique de la population, et quelle était cette influence. En particulier, existe-t-il des individus fleurissant de manière intermédiaire ? Peut-on montrer l'existence d'un cline temporel (Hendry & Day 2005) du à la phénologie ? Celle-ci influence-t-elle la structure spatiale et l'estimation des flux de gènes historiques ? Les individus intermédiaires ont-ils des caractères reproducteurs différents des espèces parentales (qui leur conféreraient des composantes de *fitness* supérieures ou inférieures à ces dernières) ? Ceci fait l'objet de l'article composant la première partie de ce chapitre, en révision pour publication dans *Molecular Ecology*.

Ayant montré l'existence d'une tendance à l'isolement par le temps, le second objectif de ces travaux consistait à savoir si cette structure pouvait être générée par des croisements préférentiels entre individus fleurissant pendant la même période. Si cet isolement temporel existe, l'effectif efficace risque de diminuer, ce qui peut être compensé par de plus longues distances de dispersion polliniques. Par ailleurs, la limitation de la quantité de pollen disponible du à l'isolement temporel peut éventuellement être compensé par une augmentation du taux d'autofécondation. Les espèces parentales sont *a priori* strictement allogames mais nous ne connaissions pas le système de reproduction des hybrides. Les analyses de paternité sont des outils puissants pour étudier conjointement l'influence de ces paramètres sur les régimes de reproduction en « temps réel » : l'adaptation d'une méthode d'estimation conjointe des paramètres de dispersion et du système de reproduction à la population hybride de Saint-Dyé a donc pu permettre de répondre à ces questions. Ceci fait l'objet de l'article présenté en deuxième de ce chapitre, en préparation pour soumission à *Evolution*.

Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *F. angustifolia* Vahl

PIERRE R. GERARD, JUAN F. FERNANDEZ-MANJARRES, NATHALIE FRASCARIA-LACOSTE

Ecologie, Systématique, Evolution, UMR CNRS-ENGREF 8079, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay cedex, France

Abstract

The two closely related ash species *Fraxinus excelsior* L. (common ash) and *F. angustifolia* Vahl. (narrow-leaved ash) have a broad contact zone in France where they hybridize. However, little is known about the local structure of hybrid zone populations and the isolation mechanisms. We assessed the potential effect of floral phenology on the structure of a riparian ash hybrid zone population in Central France. The distribution of flowering times was unimodal and lay between the flowering periods of the two species. Using microsatellite markers, we detected isolation by time, which has possibly originated from assortative mating. Multivariate analyses indicated that morphological variation is not distributed at random with respect to flowering times. Spatial autocorrelation analyses showed that temporal and spatial patterns were tightly linked. Interestingly, despite the fact that the population shows isolation by time, neighbourhood size and historical dispersal variance ($\hat{\sigma}$ = 63 m) are similar to those detected in pure stands of *F. excelsior* where individuals flower rather synchronously and hermaphrodites are not the most frequent sexual type. Trees flowering at intermediate dates, which comprised the majority of the population, produced on average more flowers and fruits. We detected no significant differences in floral parasite infections relative to reproductive timing, though there was a tendency for late flowering trees to suffer from more gall attack. We discuss the impact of temporal variation in fitness traits and their possible role in the maintenance of the hybrid zone.

Introduction

Hybridization processes and the structure of hybrid zones have long caught the attention of evolutionary biologists because of their importance to our understanding of speciation mechanisms and species boundaries: transition zones between relatively homogeneous entities can be viewed as windows onto evolutionary processes (Harrison 1990). Generally, a key question concerns the fitness of hybrids, particularly in later generations, allowing the maintenance of hybrid zones through local adaptation (exogenous selection), or through a balance between dispersal and selection against hybrids (endogenous selection) (Barton & Hewitt 1985; Arnold & Hodges 1995; Barton 2001). Hybridization is a widespread phenomenon in plants, and the hybrid origin of several species through local adaptation has been reported (Rieseberg 1997). In many tree species complexes, large hybrid zones have often been reported as a result of broad geographical ranges, long-distance pollen flow and high outcrossing rates, as is the case for *Populus* spp. (e.g. Martinsen *et al.* 2001), *Picea* spp. (e.g. Perron & Bousquet 1997) or *Quercus* spp. (e.g. Howard *et al.* 1997; Petit *et al.* 2003; Muir & Schlötterer 2005). In the case of the two European oak species *Q. petraea* and *Q. robur*, fine scale studies of the structure of a mixed population suggested a role for floral phenology (Bacilieri *et al.* 1994) and dispersal differences between species (Streiff *et al.* 1998) in shaping the strong spatial patterns observed.

Indeed, temporal isolation by divergent floral phenologies can represent a strong pre-zygotic barrier, as seems to be the case in *Salix* spp. (Mosseler & Papadopol 1989), that can be involved in ecological speciation (Coyne & Orr 2004; Rundle & Nosil 2005). The consequence is assortative mating, which can produce isolation by time patterns: the probability of mating is all the more reduced since the difference in the heritable component of reproductive timing increases (Hendry & Day 2005). Because flowering times are often strongly heritable, flowering plant populations can exhibit isolation by time even if the distributions of flowering dates are unimodal. Moreover, if selection regimes vary through the reproductive season, one can expect adaptive temporal clines in heritable phenotypic traits within populations (Hendry & Day 2005). This so-called adaptation by time may be involved in sympatric or parapatric speciation, but detecting such patterns does not provide a clear understanding of how evolutionary processes have shaped these clines. Nevertheless, studying these patterns in hybrid zones is important to our understanding of the structure of species boundaries and the maintenance of these zones. When parental species have different flowering phenologies, transition zones may be structured differently relative to the selection

regimes involved: for example, habitat disturbance can promote hybridization through a loss of temporal isolation (Lamont *et al.* 2003) or apparent selection against hybrids can contribute to maintaining assortative mating in hybrid populations (Cruzan & Arnold 1994).

The two European ash species *Fraxinus excelsior* (common ash) and *F. angustifolia* (narrow-leaved ash) represent a case of closely-related tree species with different flowering phenologies (Raquin *et al.* 2002; Jato *et al.* 2004) that hybridize in natural populations. Morphological introgression has been reported for many years but has not yet been studied intensively in natural populations. The two species have separate distributions across Europe, *F. excelsior* being widespread from Southern to Northern Europe, and *F. angustifolia* being mainly present around the Mediterranean basin. Contact zones do exist in countries at intermediate latitudes, such as France. The population genetics and phylogeography of common ash in Europe are well documented (e.g.Heuertz *et al.* 2001; Morand *et al.* 2002; Heuertz *et al.* 2004), and these studies have detected heterozygote deficiency as a peculiar characteristic of Western populations. Some studies have described population structure and gene flow at a local scale (Heuertz *et al.* 2003; Morand-Prieur 2003; Bacles *et al.* 2005) and revealed short-distance dispersal, relatively strong patterns of isolation by distance and mid to high rates of biparental inbreeding, but very low to nonexistent selfing. Indeed, the departures observed from the Hardy-Weinberg structure may, at least partly, be the consequence of these mating and dispersal characteristics. One of the first studies focusing on hybridization between these two ash species revealed the possible existence of hybrid individuals in populations in the Saône valley in France (Jeandroz *et al.* 1996). Controlled crosses yielded artificial hybrids (Raquin *et al.* 2002) which are still alive after 10 years. Recently, a large-scale study on natural populations in the Loire and Saône valleys, based on morphological and molecular data, clearly demonstrated the extensive occurrence of hybridization in France (Fernandez-Manjarrés *et al.* 2006). Intermediate morphologies and genotypes were identified, particularly in the Loire valley, and some climatic variables were detected as being correlated with distribution of the species and hybrids, principally altitude and mean annual temperatures.

We present herewith the first fine-scale study of a hybrid zone population between *F. excelsior* and *F. angustifolia*, where we examined the role of floral phenology in population structure. Our specific aims were: (1) to detect any complete pre-zygotic barrier between the two species relative to their different flowering times (i.e. a bimodal floral phenology distribution), (2) if this were not detectable, to correlate different phenologies, firstly with neutral genotypes (i.e. isolation by time patterns, Hendry & Day 2005) and with

morphological characters and secondly with potentially adaptive traits, such as fitness components and parasite infections (i.e. adaptation by time, Hendry & Day 2005), (3) to take account of spatial patterns and to assess their relationships with temporal patterns. To answer these questions, we examined the distribution and stability of flowering times by recording phenological data over two years. One particular feature of *F. excelsior* is its polygamous breeding system, so we also assessed the proportion and stability of sexual types. Secondly, we used multivariate analyses applied to nuclear microsatellite and morphological data to detect patterns correlated with flowering phenology, and we compared individuals with different flowering phenologies relative to certain fitness components (i.e. flowering and fruiting intensity) and floral gall attacks. Finally, we used spatial auto-correlation methods (Goreaud 2000; Vekemans & Hardy 2004) to determine whether genetic isolation by distance (IBD) patterns were correlated with flowering time IBD patterns.

Materials and methods

Study species and sampling

Study organisms. Common ash, *F. excelsior* L., and narrow-leaved ash, *F. angustifolia* Vahl., are temperate forest tree species that are widespread in France. The former has a broad distribution throughout the country, but is almost absent from the Mediterranean coast, while the latter is mainly present in Southern France (Franc & Ruchaud 1996). An ITS-sequence phylogeny reconstruction indicates that these species are closely related (Jeandroz *et al.* 1997). Even though overall genetic divergence may be very low, the two ash species exhibit physiological and biochemical differences concerning iridoid glucoside biosynthesis (Jensen *et al.* 2002), malate and mannitol production in response to water stress (Oddo *et al.* 2002), and dormancy (Gérard *et al.* 2006), suggesting that different selection regimes may have shaped their distributions in Europe. Indeed, they have different environmental preferences: *F. angustifolia* is more riparian than the other (Marigo *et al.* 2000), and is found in regions with milder climatic conditions (Fernandez-Manjarrés *et al.* 2006).

Both species are post-pioneer forest trees with a colonizing behaviour, and they have a discontinuous spatial distribution across Europe (Heuertz *et al.* 2004). They are often found mixed with other species such as oak or maple (Morand *et al.* 2002). The pollen and fruits of these two ash species are wind-dispersed, and flowering is protogynous, although anther dehiscence occurs while the stigma is still receptive. *F. excelsior* has a relatively well-

described complex breeding system: sexual types vary across a continuum from pure male individuals to pure females, with all kinds of hermaphrodites in between (Wardle 1961; Binggeli & Power 1999; Wallander 2001; Morand-Prieur *et al.* 2003). On the other hand, the mating system of *F. angustifolia* is unclear but some authors described it as polygamous as well (Rameau *et al.* 1989; Wallander 2001). The two species exhibit differences in their phenology, the *F. excelsior* flowering from mid-March to the beginning of April, while the start of the *F. angustifolia* flowering period is more variable depending on the year, ranging from mid-December to the end of January (Raquin *et al.* 2002; Jato *et al.* 2004).

According to Picard (1983), several zones of sympatry do exist, particularly in alluvial plains such as the Loire and Saône valleys, where morphologically intermediate individuals have been reported. Therefore, we decided to study an ash stand along the Loire valley, within which morphological variation was very large. With the exception of some typical individuals from each species, most individuals exhibit a combination of the classically described species discriminative morphological characters (mainly based on leaf, bud and trunk morphology) (e.g. Rameau *et al.* 1989).

Sampling site. The study population is located at Saint-Dyé-sur-Loire (latitude 47° 39’ 10’’ N, longitude 1° 28’ 40’’ E, altitude 78 m), on the banks of the river Loire in central France. This is an almost pure stand of ash covering an area of about 7 ha, which has apparently resulted from natural regeneration, and the mild climatic conditions seem to favour the presence of both ashes (Fernandez-Manjarrés *et al.* 2006). All 289 adult individuals were sampled and spatial coordinates were obtained with 1-m resolution using a Trimble® GPS unit (Trimble, Sunnyvale, CA, USA), and transformed from decimal degrees to Lambert II coordinates using Circé2000 software (available at http://www.ign.fr/). A map was built using DIVA-GIS software (available at http://www.diva-gis.org/) (Fig. 1).

Field survey. We characterised all adult trees within the study site by their diameter at breast height (DBH > 10 cm). The following morphological variables were measured: (1) bud colour (evaluated using a Munsell soil colour code: 7.5YR 2/0 to 7.5YR 3/4, and translated into seven classes) and verticillation (estimated proportion of verticils with three buds relative to verticils with two opposite buds, translated into five levels), (2) leaf length and leaf petiole length, (3) majority numbers of leaflets (minimum and maximum) estimated from more than one hundred leaves harvested in different positions in the trees, (4) length and width of the distal and second leaflets, position of the greatest width on the length axis, and the length of

the distal leaflet petiole. Some variables were derived in ratios (e.g. leaflet length/width) to provide an indicator of the shape rather than the size of the organ studied, and these ratios were arcsine-transformed to normalize the data and stabilize the variance.

Sexual type of each individual was recorded over two years (2003 and 2004) and ranged into four classes (MM, MH, HM, HH respectively corresponding to pure males and three types of hermaphrodites, the first letter representing the dominant flower type). No females were detected during these two years of observation. The floral phenology of each tree was followed every week during the two years from mid-December to mid-April, and translated into eight classes depending on the flushing date, just before pollen offset (one class = two weeks).

Flowering and fruiting intensities were also recorded during the two years of the survey using a 5-level classification relative to tree size. The intensity of gall attacks was recorded in 2003, using a 4-level classification. These attacks are caused by the gall mite *Eriophyes fraxiniflora,* which attacks male ash (staminate) flowers (Wardle 1961).

Molecular assays

Total DNA was extracted from dried material issued from 50 mg of fresh leaves as described in Fernandez-Manjarrés *et al.* (2006), using a DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen). All individuals were genotyped at eight nuclear microsatellite loci: M-230 (Brachet *et al.* 1999), FEMSATL 4, 11, 16, 19 and FEMSATL 8, 10, 12 (Lefort *et al.* 1999). The first five were characterized as described in previous studies (e.g. Heuertz *et al.* 2001; Morand *et al.* 2002; Heuertz *et al.* 2004). New primers were redefined for FEMSATL 12 to avoid null alleles (ME Morand-Prieur, pers. comm.): 5'-TGGCTATCAATGGTGGACAG-3' and 5'-TGCAATTTCTTATAGGGGC-3' (T_a = 52°C). PCR amplifications for FEMSATL 10 and 12 were carried out following Lefort *et al.* (1999). Amplification cycles were modified to adapt FEMSATL 8 genotyping to fluorescent techniques: after an initial denaturation step of 5 min at 94°C, PCR consisted of 45 cycles with 1 min at 94°C, 1 min at 52°C and 1 min 30 s at 72°C, followed by a final elongation of 10 min at 72°C. Mendelian segregation of alleles for the last three markers was tested on controlled crosses (data not shown). The forward sequence of each primer pair was labelled with a fluorescent dye (6-FAM or HEX) and detection was achieved with an FM-BIO II scanner (Hitachi Software).

Data analyses

Sex stability and flowering phenology. We tested the stability of sex expression and floral bud flushing date by repeatability analyses using the GLM procedure in SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). Intra-class correlations (r_I) were calculated using the method described by Zar (1984). Given the flowering periods of the two species, we grouped trees that flowered before the end of January into the first "phenological class" (representing a putative "*F. angustifolia*-like group"), and those that flowered after mid-March into the last (fifth) phenological class (representing a putative "*F. excelsior*-like group"), the other three groups being considered as intermediate. We used these five classes of floral bud flushing dates as class variables for subsequent statistical and genetic analyses.

Comparing morphological and genetic variation to parental species populations. We used parental populations of the two species as references (described in Fernandez-Manjarrés *et al.* 2006): five of pure *F. angustifolia* from Southern France (Grabels, Cuxac-d'Aude, Mas-Larrieu, Cazouls-lès-Béziers and Boujan-sur-Libron) and three of pure *F. excelsior* from Northern France (La Romagne, St-Martin d'Ablois, St-Gobain). In these populations, individuals were characterised by four morphological variables (majority minimum and maximum number of leaflets, length and width of the second leaflet) and genotyped at five microsatellite loci (M-230, FEMSATL 4, 11, 16, 19).

We performed Principal Component Analysis (PCA) on leaf morphological variables, using the PRINCOMP procedure in SAS, in order to summarize variation in the original variables among individuals. In order to compare the morphology in phenological groups relative to the parental species, we conducted a Canonical Discriminant Analysis (CDA) using the DISCRIM procedure in SAS, with reference populations and phenological groups as class variable.

To assess genetic relationships between reference populations and phenological groups, an un-rooted Neighbour-Joining (NJ) tree (Saitou & Nei 1987) was constructed based on the stepwise weighted distance (D_{SW}) of Shriver *et al.* 1995) for highly polymorphic microsatellites (Stepwise Mutation Model). We performed 1000 bootstraps on loci using POPULATIONS (available at http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations) and the tree was analysed with PHYLIP 3.6 (available at http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html).

Genetic structure. Genetic diversity parameters (number of alleles A, effective number of alleles A_e, observed heterozygosity H_o, expected heterozygosity H_e, population inbreeding F_{IS}) were estimated using FSTAT (Goudet 1995), within and among phenological groups. Pairwise differentiation coefficients (F_{ST}) between groups were also estimated, as well as R_{ST} (Slatkin 1995), which takes account of variance in allele size and was defined for markers undergoing Stepwise-Mutation Model (e.g. microsatellites). Goodman's estimators of R_{ST} were calculated using R_{ST}Calc software (Goodman 1997). Significance of F_{IS}, F_{ST} and R_{ST} was tested using randomisation procedures. Numbers of significant pairwise linkage disequilibria were also obtained by multiple G-tests, after sequential Bonferroni corrections reducing the total type I error to 5%.

To depict the genetic coherence of the phenological groups, we derived a linear discriminant function from the pooled covariance matrix of the multivariate genotypes (Smouse *et al.* 1982) using the DISCRIM procedure in SAS and assessed the power of re-assignment of individuals in the groups.

Morphological structure, fitness components and gall attack. We performed a CDA on the 12 morphological variables studied in St-Dyé, in order to assess morphological variation among phenological groups and detect other diagnostic variables. Fitness component variations between different phenological groups, as well as differences in gall attack, were tested by non-parametric one-way ANOVAs using Kruskall-Wallis rank tests with NPAR1WAY in SAS. We controlled for size of the trees by performing the same test on DBH differences between groups. Multiple comparisons between groups were made using Dunn *post-hoc* tests (Zar, 1984).

Spatial genetic and phenological patterns. The spatial component of the fine-scale genetic structure was assessed using spatial auto-correlation methods. A kinship estimator between pairs of mapped individuals [F_{ij} of Loiselle *et al.* (1995)] was computed using the SPAGeDi v1.2 software (Hardy & Vekemans 2002). The hypothesis of isolation by distance was tested by regression of the matrix of pairwise F_{ij} against the matrix of the logarithm of pairwise geographical distances. This was rendered possible by using the slope of this regression (b) as statistic (Vekemans & Hardy 2004). The significance of $\hat{b}$ was evaluated by 15000 random permutations of spatial locations among individuals. This estimator provided an indirect estimate of historical gene flow (Oddou-Muratorio *et al.* 2004) through Wright's

'neighbourhood size' defined as $N_b = 4\pi D\sigma^2$, where D is the effective population density and σ^2 is the variance of gene dispersal distances. Otherwise, N_b can be estimated as $\hat{N}_b = -(1 - F_{is})/\hat{b}$, where F_{is} is Wright's inbreeding coefficient in the population. The gene dispersal parameter σ was estimated using an iterative procedure implemented in SPAGeDi.

We also performed spatial auto-correlation analysis of floral phenology and DBH using the function *Kcor* of Goreaud (2000) used and described by Oddou-Muratorio *et al.* (2004). This function measures the mean correlation between the values of a quantitative or semi-quantitative variable borne by an arbitrary tree and its neighbours within a given distance class. We applied the edge-effect correction for rectangular shaped sampling plots (Goreaud & Pélissier 1999). The distribution of *Kcor* was tested at a 5% level of significance using Monte-Carlo simulations of the null hypothesis of no correlation through the random reallocation of values of the variable over the tree positions. These analyses were performed using a MATLAB® (MathWorks Inc., Natick, MA, USA) routine adapted from Goreaud 2000) (available upon request from PRG).

In order to provide a graphical representation of spatial phenological patterns, we performed a kriging analysis on flowering time data using MATLAB® functions of gridding. Isoclines were obtained by linear interpolation of the data, where estimated points were linear combinations of sampled points.

Results

Sex expression and flowering phenology

We found that the population of St-Dyé contained a majority of hermaphrodite individuals (91.8% including 52% of pure hermaphrodites HH, 29.5% of HM and 10.3% of MH) and very few pure males MM (2%). Only 6.2% of the individuals did not flower. Sex expression was highly stable over the two years ($r_I = 0.72$, $F_{262,263} = 2.56$, $P < 0.0001$). The distribution of floral bud flushing dates was unimodal with a maximum during the first two weeks of February [15 Dec.-31 Jan.: 12.5% (group 1 "*Angustifolia*"); 01 Feb.-15 Feb.: 35.6% (group 2); 16 Feb.-28 Feb.: 22.8% (group 3); 01 Mar.-15 Mar.: 17.3% (group 4); 15 Mar.-15 Apr.: 11.8% (group 5 "*Excelsior*")]. The floral bud flushing date was highly repeatable over years among individuals ($r_I = 0.74$, $F_{262,263} = 2.79$, $P < 0.0001$).

Comparison with reference populations

The first principal component (PCA 1), to which the majority number of leaflets (minimum and maximum) made a high contribution (68.3%), explained 51.5% of the overall variation among *individuals*. PCA 1 values of *F. angustifolia* showed less than 5% of overlap in the range of *F. excelsior*, and the distribution in St-Dyé was centred at 0 and overlapped with the distributions in the two species (Fig. 2A).

The first two canonical variables (CDA 1 and CDA 2) explained almost all *inter-group* variation (95.6%) and the corresponding canonical correlations were significantly different from 0 (see Table 1 in supplementary material). The majority number of leaflets was also highly correlated with the CDA 1 (94%), which differentiated Northern (*F. excelsior*) and Southern (*F. angustifolia*) populations of ash species and revealed a cline of leaf morphology relative to flowering time (Fig. 2B).

The reference populations of the two species grouped together with high bootstrap supports in the NJ tree based on genetic data (70% and 74% for *F. angustifolia* and *F. excelsior* respectively), and the phenological groups branched between them with moderate bootstrap support (Fig. 3). The early flowering group (Group 1) had strong affinity to *F. angustifolia* populations and the late flowering one (Group 5) to *F. excelsior* populations.

Temporal structure of the study population

Genetic variation. Allele number and genetic diversity (H_o) were very high in the entire population, except for microsatellite locus FEMSATL 16 (Table 1A), which was consistent with the findings of a large-scale study in the Loire valley (Fernandez-Manjarrés *et al.* 2006). F_{IS} values were highly variable among loci: two loci did not exhibit any significant departure from Hardy-Weinberg proportions (FEMSATL 4 and 11), four loci exhibited moderate heterozygote deficiency (M2-30, FEMSATL 8, 12 and 19), and two exhibited very high levels of heterozygote deficiency (FEMSATL 10 and 16, $F_{IS} > 0.23$), the latter with very few alleles (Table 1A). The magnitude of heterozygote deficiency also varied between phenological groups, being very high for extreme groups (early and late flowering: $F_{IS} > 0.12$) and moderate in intermediate flowering groups. Moreover, the proportion of significant linkage disequilibria, which was very high in the whole population (17/28), was null or very low within groups (Table 1B).

Differentiation between flowering groups was very low: F_{ST} = 0.001 and R_{ST} = 0.005, the only significant values of differentiation being those between group 5 and the others (group 1: F_{ST} = 0.008, P < 0.05, R_{ST} = 0.038, P < 0.01; group 2: F_{ST} = 0.006, P < 0.05, R_{ST} = 0.026, P < 0.01; group 3: R_{ST} = 0.015, P < 0.05; group 4: R_{ST} = 0.015, P < 0.05). However, the discriminant function showed a good genetic coherence of the groups, as the error rate of re-assignment was very low (Table 2). The genetic relationships between groups that appeared in Fig. 3 were also detected with eight markers (see Fig. 1 in supplementary material), with a cline in allele frequencies at the FEMSATL 19 locus that had a tendency towards small alleles for the early flowering groups (data not shown).

Morphological variation, fitness components and gall attacks. The CDA performed on the 12 morphological variables available for St-Dyé showed again a cline in morphological traits. The first canonical correlation was significantly different from 0 (LR = 0.55, $F_{48,864.9}$ = 3.08, P < 0.0001): the CDA 1 explained 76.5% of the total variation and was highly positively correlated with the number of leaflets, highly negatively correlated with bud verticilation, and moderately correlated with shape and other morphological variables (see Fig.2 and Table 2 in supplementary material).

Flowering intensities varied significantly across phenological groups in both years (2003: χ^2_4 = 50.73, P < 0.0001, 2004: χ^2_4 = 24.50, P < 0.0001) but differently over the two years: in 2003, intermediate flowering trees produced significantly more flowers than those flowering at the extremes, and in 2004, early flowering trees produced significantly more flowers than the others (Table 3). Fruiting intensities also varied significantly across phenological groups in both years (2003: χ^2_4 = 42.27, P < 0.0001, 2004: χ^2_4 = 11.37, P < 0.05) in a similar way: intermediate flowering trees produced significantly more fruits than those flowering at the extremes (Table 3).

Gall attack intensities did not differ across phenological groups in 2003 (χ^2_4 = 7.40, P = 0.116), though early flowering trees were on average less severely infected than late flowering ones (Table 3). Tree DBH differed significantly across phenological groups (χ^2_4 = 26.15, P < 0.0001) with early flowering groups being larger (Table 3).

Spatial genetic and phenological patterns

Isolation by distance was observed at a fine scale within the population, with trees separated by less than 50 meters being genetically more similar than random individuals in the population (the kinship coefficient estimator F_{ij} was significantly higher than zero) (Fig. 4A). The iterative procedure (Vekemans & Hardy 2004) estimated an effective neighbourhood size of 202 individuals and a gene dispersal parameter of $\hat{\sigma}$ = 63 m.

Significant positive spatial auto-correlations of flowering dates and diameters were found: trees separated by less than 80 meters had closer flowering times than two random individuals in the population (Fig. 4B), and trees separated by less than 150 meters were more similar in terms of their DBH than two random individuals (Fig 4C). The graphical representation of phenological grouping relative to spatial positions in the stand showed no spatial flowering cline along the population, but mostly a "patchy" distribution (Fig. 4D), and distances from the Loire river did not differ significantly between the phenological groups (Kruskall-Wallis test: χ^2_4 = 2.93, P = 0.5688).

Discussion

Our findings highlight the role of flowering phenology in structuring a hybrid zone population between two parental species with non-overlapping flowering times. We detected isolation by time patterns and variations in fitness components throughout the reproductive season, suggesting that hybrids and parental species might have different fitness in this hybrid zone.

Stability of sex expression and phenology

We showed that, as in *F. excelsior* populations (Morand-Prieur 2003), sex expression was highly stable over two years of observation. The distribution of sexual types, with a predominance of hermaphrodite individuals, differed considerably from *F. excelsior* (Wallander 2001; Morand-Prieur 2003). Half of the pure males flowered late, as expected for *F. excelsior*, though the three other pure males flowered early in both years. Thus it appeared that *F. angustifolia* may also have androdioecious populations, as is the case in several other ash species (e.g. Ishida & Hiura 2002; Verdú 2004), rather than being polygamous. Several observations in natural populations of this species tend to confirm this feature (Gérard *et al*., pers. obs.). Given their phenology and their small number, male trees in the population

probably did not sire many offspring, rendering the mating system different from that of *F. excelsior*. Indeed, better seed siring success for males rather than hermaphrodites has been detected in controlled crosses of *F. excelsior* (Morand-Prieur *et al.* 2003) and in a French natural population (Morand-Prieur 2003). If the male fertility of hermaphrodites increased in this hybrid zone population, this might reduce the variance in male and female reproductive success, thereby increasing the effective population size. The magnitude of this effect in *F. excelsior* will depend little on selfing rates because it is an outcrossed species (Heuertz *et al.* 2003; Morand-Prieur 2003; Bacles *et al.* 2005), but we have no knowledge of selfing avoidance in *F. angustifolia*.

If the relative frequencies of different sexual types may have less effect on the structure of the present population than in *F. excelsior*, flowering phenology should play an important role in shaping patterns of genetic and phenotypic variations. Temporal isolation was not complete here as we did not detect any bi-modal distribution of flowering dates. But even with overlapping flowering dates following a unimodal distribution, assortative mating and thus partial reproductive isolation are possible (Fox 2003; Hendry & Day 2005). In the present case, given the length of the flowering season, we can hypothesize strong assortative mating. In this context, it is important to know whether these flowering dates are heritable (Hendry & Day 2005). We showed in this population that flowering dates were very stable for individuals between years, which may indicate genetic determination of this trait, but this heritability needs to be confirmed using controlled crosses. Methods to estimate heritability in natural populations based on relatedness coefficients and phenotypic correlations (Ritland 2000) provided us with an estimate of the heritability of flowering date of $\hat{h}^2 = 0.33$ (Gérard and Fernandez-Manjarrés, unpublished results), which may be greatly underestimated (Coltman 2005).

Temporal structure of the population

The slight temporal genetic cline detected in the NJ tree, either on five or eight markers, indicated isolation by time (IBT) patterns: genetic differences increased with increasing differences in phenology. This IBT is likely to occur when phenology is highly heritable. The cline was not pronounced because of the slight genetic divergence between the two species and the low level of differentiation (Fernandez-Manjarrés *et al.* 2006). We chose this 5-group classification because of the lack of power of genetic clustering methods when applied on our

data (e.g. STRUCTURE by Pritchard *et al.* (2000), data not shown). Moreover, this constituted the optimal grouping in terms of linkage disequilibrium and error rates of re-assignment with the discriminant function. According to Hendry & Day (2005), analyses performed at the individual level may be better for demonstrating IBT in a continuous manner. We performed regression analyses and auto-correlations of several pairwise relatedness coefficients relative to the difference in reproductive times (Pressoir & Berthaud 2004): they revealed a trend but not a very strong pattern, due to the relatively low level of divergence (results not shown). The low rates of linkage disequilibrium within the phenological groups, and the high proportion of significant disequilibria in the whole population (which is not the case in *F. excelsior* populations: Morand-Prieur 2003; Heuertz *et al.* 2004), also indicated that this was an admixed population composed of several groups of individuals reproducing preferentially amongst themselves (Hendry & Day 2005). However, we were not able to detect a temporal Wahlund effect, the overall F_{IS} not being uniformly greater than that estimated within the temporal groups. Differences in these values are inversely related to the sizes of phenological groups, thus the high values found in extreme groups could be due to a reduction in the effective size of reproducers. The high F_{IS} values reflected a high level of heterozygote deficiency, as has been well documented and discussed in studies on *F. excelsior* in Western Europe (e.g. Morand *et al.* 2002; Heuertz *et al.* 2004; Bacles *et al.* 2005).

Although a high variability in hybrid phenotypes, we also observed a temporal cline in morphology for several traits between the characteristics of the two species. The variables with greatest explanatory power were the number of leaflets and bud verticilation. The lower number of leaflets, and their more lanceolate form (represented by the width/length ratio) in *F. angustifolia* morphotypes have been detected at a large scale and may account for adaptation to Mediterranean climates (see a discussion in Fernandez-Manjarrés *et al.* 2006). The bud verticilation was another trait that has been shown here to correlate with flowering time: the 3-bud verticilation in *F. angustifolia* is known to be due to developmental shifts during the first years of growth (Ramirez De Arellano Jimenez 2005), increasing branching in adult trees compared with *F. excelsior*. This character may potentially help *F. angustifolia* individuals to compensate smaller leaves by increasing their number. Our results in this population suggest that there may be indirect assortative mating, since many morphological traits correlate with flowering phenology (Weis 2005).

When IBT is present, variation in selection through the reproductive season may lead to adaptive temporal variation in phenotypic traits (Hendry & Day 2005). For example, this is

the case for the reproductive lifespan of salmonid fishes (e.g. Hendry *et al.* 2004) or flower numbers or fruit numbers (e.g. Dieringer 1991). Fitness traits such as flower numbers and fruit numbers may reflect adaptive trends that can potentially vary through the reproductive season: they can be interpreted as reflecting trade-offs with other fitness components. For example increased seedling survival rates are correlated to fewer flowers and late flowering in *Silene latifolia* (Purrington & Schmitt 1998). In this same species late flowering and fewer flowers allow avoidance of infections by a florally transmitted fungal parasite (Biere & Antonovics 1996). Here we observed fewer flowers in the late flowering group in 2004, but both extreme phenological groups produced fewer flowers in 2003. In both years, intermediate individuals produced more fruits. Hence, less flower and fruit production could possibly reflect a trade-off in late reproducers, but further work is needed to assess possible different survival rate of seedlings issued from different phenological groups. It is less clear for early reproducers, which may contribute to subsequent generations more by male than by female function: even when trees produce more flowers, their fruit production is on average very low. Our results may be influenced by age effects but the largest trees did not always show the highest flower or fruit set, at least during the study period. Seasonal variation in reproductive timing may also be favoured to avoid parasite infections (Biere & Antonovics 1996; Fox 2003; Weis & Kossler 2004). In the present case, resistance to floral galls may help stabilizing the divergence of reproductive timing, because early reproducers tended to be less infected, and could be a factor influencing reduced flower production in late reproducers.

Intermediate flowering times, which may correspond to variable hybrid phenotypes, may represent a selected compromise in this region where winters are not too hard and frost periods not too long, although sufficient to reduce the fitness of early reproducers. This could contribute in maintaining this hybrid zone: as long as intermediate habitats remain accessible to intermediate forms which are not counter-selected, the temporal isolation will not be complete.

Spatial patterns

The spatial auto-correlation pattern found here was similar to that usually observed for forest tree species, and particularly for *F. excelsior* (Morand-Prieur 2003). Even with increased temporal isolation, the resultant historical gene flow estimated in St-Dyé ($\hat{\sigma}$ = 63 m) was very close to that estimated in a French *F. excelsior* population ($\hat{\sigma}$ = 61 m). *Fraxinus excelsior* populations, however, are composed of a great number of males and some females, these

males having a better reproductive success than hermaphrodites (Morand-Prieur 2003). It has been shown that gynodioecy can decrease the effective population size (Laporte *et al.* 2000). If trioecy has the same effect in *F. excelsior*, it would not be the case here, as only hermaphrodites are present. Limits in phenological overlap, however, may decrease the effective size of this hybrid population, rendering a neighbourhood size similar to that of *F. excelsior*, despite the abundance of highly fertile, hermaphrodite individuals.

These spatial genetic patterns were tightly linked to phenology, because we observed almost the same spatial auto-correlation patterns for flowering time, and spatial auto-correlation patterns were also found for DBH. Thus the patches observed may correspond to closely related seedlings regenerated at the same time, co-flowering at the adult stage. The spatial pattern of adult trees, with no particular structuring relative to distance from the Loire river bore no apparent relation to sensitivity to water-logging. It may be interesting to test the distribution of different flowering groups relative to ecological characters (e.g. local soil characteristics, pH). However, the stand may be too narrow to allow any detection of ecological preferences between the two species and hybrids.

In conclusion, this study showed that a hybrid zone population can not only be structured in space but also by seasonal variation in reproductive times. Although assortative mating needs to be clearly demonstrated at the seed stage by paternity analysis (Gérard *et al.*, in preparation), we showed detectable isolation by time, which was correlated with variation in fitness traits and possibly with parasite attacks. Given the over-representation of intermediate individuals and their mean values for fitness components over the two years, it is possible that intermediate flowering trees are the best adapted in the region, which may contribute to maintaining the hybrid zone where all parental and hybrid forms coexist. Further work is needed to investigate the reproductive success of these intermediate and extreme forms. Moreover, whether IBT and IBD patterns are similar in other hybrid populations where sex ratio may be closer to those of *F. excelsior* remains also to be explored.

References

Arnold ML, Hodges SA (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 67-71.

Bacilieri R, Labbe T, Kremer A (1994) Intraspecific genetic structure in a mixed population of *Quercus petraea* (Matt.) Leibl and *Q. robur* L. *Heredity*, **73**, 130-141.

Bacles CFE, Burczyk J, Lowe AJ, Ennos RA (2005) Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. *Evolution*, **59**, 979-990.

Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 113-148.
Barton NH (2001) The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, **10**, 551-568.
Biere A, Antonovics J (1996) Sex specific costs of resistance to the fungal pathogen *Ustilago violacea* (*Microbotryum violaceum*) in *Silene alba*. *Evolution*, **50**, 1098-1110.
Binggeli P, Power J (1999) Gender variation in ash (*Fraxinus excelsior* L.). http://members.tripod.co.uk/WoodyPlantEcology/species/ash.htm.
Brachet S, Jubier MF, Richard M, Jung-Muller B, Frascaria-Lacoste N (1999) Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*. *Molecular Ecology*, **8**, 157-168.
Coltman DW (2005) Testing marker-based estimates of heritability in the wild. *Molecular Ecology*, **14**, 2593-2599.
Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
Cruzan MB, Arnold ML (1994) Assortative mating and natural selection in an *Iris* hybrid zone. *Evolution*, **48**, 1946-1958.
Dieringer G (1991) Variation in individual flowering time and reproductive success of *Agalinis strictifolia* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, **78**, 497-503.
Fernandez-Manjarrés JF, Gérard PR, Dufour J, Raquin C, Frascaria-Lacoste N (2006) Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *F. angustifolia* Vahl. (Oleaceae) in Eastern and Western France. *Molecular Ecology*, **in press**.
Fox GA (2003) Assortative mating and plant phenology: evolutionary and practical consequences. *Evolutionary Ecology Research*, **5**, 1-18.
Franc A, Ruchaud F (1996) Le Frêne commun. In: *Autécologie des feuillus précieux : Frêne commun, Merisier, Erable sycomore, Erable plane*, pp. 15-68. C.E.M.A.G.R.E.F. Editions, Riom, France.
Gérard PR, Fernandez-Manjarrés JF, Bertolino P*, et al.* (2006) New insights in the recognition of the European ash species *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl as useful tools for forest management. *Annals of Forest Science*, **in press**.
Goodman SJ (1997) RSTCalc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, **6**, 881-885.
Goreaud F, Pélissier R (1999) On explicit formulas of edge effect correction for Ripley's *K* function. *Journal of Vegetation Science*, **10**, 433-438.
Goreaud F (2000) *Apports de l'analyse de la structure spatiale en forêt tempérée à l'étude et la modélisation des peuplements complexes* PhD Thesis, ENGREF Paris.
Goudet J (1995) FSTAT, a program to estimate F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485-486.
Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population level. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 618.
Harrison RG (1990) Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford Survey in Evolutionary Biology*, **7**, 69-128.
Hendry AP, Morbey YE, Berg OK, Wenburg JK (2004) Adaptive variation in senescence: reproductive lifespan in a wild salmon population. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **271**, 259-266.
Hendry AP, Day T (2005) Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. *Molecular Ecology*, **14**, 901-916.
Heuertz M, Hausman JF, Tsvetkov I, Frascaria-Lacoste N, Vekemans X (2001) Assessment of genetic structure within and among Bulgarian populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Molecular Ecology*, **10**, 1615-1623.

Heuertz M, Vekemans X, Hausman JF, Palada M, Hardy OJ (2003) Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Molecular Ecology*, **12**, 2483-2495.
Heuertz M, Hausman JF, Hardy OJ*, et al.* (2004) Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern european populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, **58**, 976-988.
Howard DJ, Preszler RW, Williams J, Fenchel S, Boecklen WJ (1997) How discrete are oak species? Insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Quercus gambelii*. *Evolution*, **51**, 747-755.
Ishida K, Hiura T (2002) Mating system and population genetic structure of an androdioecious tree, Fraxinus lanuginosa Koidz. (Oleaceae) in northern Japan. *Heredity*, **88**, 296-301.
Jato V, Rodriguez-Rajo FJ, Dacosta N, Aira MJ (2004) Heat and chill requirements of *Fraxinus* flowering in Galicia (NW Spain). *Grana*, **43**, 217-223.
Jeandroz S, Frascaria-Lacoste N, Bousquet J (1996) Molecular recognition of the closely related *Fraxinus excelsior* and *F. oxyphylla* (Oleaceae) by RAPD markers. *Forest Genetics*, **3**, 237-242.
Jeandroz S, Roy A, Bousquet J (1997) Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus Fraxinus (Oleaceae) based on Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **7**, 241-251.
Jensen SR, Franzyk H, Wallander E (2002) Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*, **60**, 213-231.
Lamont BB, He T, Enright NJ, Krauss SL, Miller BP (2003) Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 551-557.
Laporte V, Cuguen J, Couvet D (2000) Effective population sizes for cytoplasmic and nucear genes in a gynodioecious species: the role of the sex determination system. *Genetics*, **154**, 447-458.
Lefort F, Brachet S, Frascaria-Lacoste N, Edwards KJ, Douglas GC (1999) Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). *Molecular Ecology*, **8**, 1075-1092.
Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, **82**, 1420-1425.
Marigo G, Peltier J-P, Girel J, Pautou G (2000) Success in the demographic expansion of *Fraxinus excelsior* L. *Trees*, **15**, 1-13.
Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P (2001) Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution*, **55**, 1325-1335.
Morand-Prieur M-E, Raquin C, Shykoff JA, Frascaria-Lacoste N (2003) Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). *American Journal of Botany*, **90**, 949-953.
Morand-Prieur M-E (2003) *Evolution et maintien d'un système de reproduction polymorphe. Approche génétique et écologique de la polygamie chez le frêne commun, Fraxinus excelsior L.* PhD Thesis, ENGREF Paris.
Morand M-E, Brachet S, Rossignol P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N (2002) A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology*, **11**, 377-385.
Mosseler A, Papadopol CS (1989) Seasonal isolation as a reproductive barrier among sympatric *Salix* species. *Canadian Journal of Botany*, **67**, 2563-2570.

Muir G, Schlötterer C (2005) Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus* spp.). *Molecular Ecology*, **14**, 549-561.
Oddo E, Saiano F, Alonzo G, Bellini E (2002) An investigation of the seasonal pattern of mannitol content in deciduous and evergreen species of the Oleaceae growing in Northern Sicily. *Annals of Botany*, **90**, 239-243.
Oddou-Muratorio S, Demesure-Musch B, Pélissier R, Gouyon P-H (2004) Impacts of gene flow and logging history on the local genetic structure of a scattered tree species, *Sorbus torminalis* L. Crantz. *Molecular Ecology*, **13**, 3689-3702.
Perron M, Bousquet J (1997) Natural hybridization between black spruce and red spruce. *Molecular Ecology*, **6**, 725-734.
Petit RJ, Bodénès C, Ducousso A, Roussel G, Kremer A (2003) Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist*, **161**, 151-164.
Picard J-F (1983) A propos du frêne oxyphylle, *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Forêt-Entreprise*, **83**, 2-4.
Pressoir G, Berthaud J (2004) Patterns of population structure in maize landraces from the Central Valleys of Oaxaca in Mexico. *Heredity*, **92**, 88-94.
Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
Purrington CB, Schmitt J (1998) Consequences of sexually dimorphic timing of emergence and flowering in *Silene latifolia*. *Journal of Ecology*, **86**, 397-404.
Rameau JC, Mansion D, Dumé G (1989) *Flore forestière française, guide écologique illustré. Tome 1. Plaines et collines*. Institut pour le Développement Forestier, Paris.
Ramirez De Arellano Jimenez F (2005) *Variabilité morphologique, anatomique et architecturale du frêne oxyphylle (Fraxinus angustifolia Vahl. ssp angustifolia)*. PhD Thesis, Université Montpellier II.
Raquin C, Brachet S, Jeandroz S, Vedel F, Frascaria-Lacoste N (2002) Combined analyses of microsatellite and RAPD markers demonstrate possible hybridisation between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. *Forest Genetics*, **9**, 103-111.
Rieseberg LH (1997) Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**, 359-389.
Ritland K (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, **9**, 1195-1204.
Rundle HD, Nosil P (2005) Ecological speciation. *Ecology Letters*, **8**, 336-352.
Saitou N, Nei M (1987) The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
Shriver MD, Jin L, Boerwinkle E*, et al.* (1995) A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 914-920.
Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
Smouse PE, Spielman RS, Park MH (1982) Multiple-locus allocation of individuals to groups as a function of the genetic variation within and differences among human populations. *The American Naturalist*, **119**, 445-463.
Streiff R, Labbe T, Bacilieri R*, et al.* (1998) Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology*, **7**, 317-328.
Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, **13**, 921-935.
Verdú M (2004) Physiological and reproductive differences between hermaphrodites and males in the androdioecious plant *Fraxinus ornus*. *Oikos*, **105**, 239-246.

Wallander E (2001) *Evolution of wind-pollination in Fraxinus (Oleaceae) - an ecophylogenetic approach.* PhD Thesis, Göteborg University.
Wardle P (1961) Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L. *Journal of Ecology*, **49**, 739-751.
Weis AE, Kossler TM (2004) Genetic variation in flowering time induces phenological assortative mating: quantitative genetic methods applied to *Brassica rapa*. *American Journal of Botany*, **91**, 825-836.
Weis AE (2005) Direct and indirect assortative mating: a multivariate approach to plant flowering schedules. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 536-546.
Zar JH (1984) *Biostatistical analysis, Second Edition*. Prentice-Hall Inc., London, UK.

Acknowledgements

We would like to thank A Carpentier and L Nowak for field assistance. We also thank JA Shykoff, F Austerlitz, F Lefèvre, P Saumitou-Laprade, J Dufour, ME Morand-Prieur, C Raquin, J Bousquet, A Widmer and five anonymous reviewers for helpful discussions and comments on earlier drafts of the manuscript. PRG received financial support from the French Ministry of Education and the French Institute for Biodiversity (IFB). This work was funded by the DGFAR (Ministry of Agriculture), IFB and European Union (RAP Project QLK5-2001-00631) grants to NFL. JFFM benefited from post-doctoral fellowships from the EU and IFB.

Fig. 1 Map of the study site and distribution of ash trees. Black circles represent adult individuals.

Fig. 2 PCA and CDA on morphological variables. (A) Distribution of first principal component in *F. excelsior* populations (blue bars), *F. angustifolia* populations (red bars) and the St-Dyé population (black bars). (B) Summary of the first and second canonical variables in *F. excelsior* populations (blue), *F. angustifolia* populations (red) and five phenological groups of the St-Dyé population (gradient of grey: light grey corresponds to group 1 of early flowering trees, and dark grey corresponds to group 5 of late flowering trees): diamonds represent means of the populations or groups and ellipses represent standard deviations.

Fig. 3 Un-rooted NJ tree based on the stepwise weighted distance (D_{SW}) of Shriver *et al.* 1995) for microsatellite markers, between phenological groups in St-Dyé (SD) and parental species populations (*F. ang.* = *F. angustifolia*, *F. exc.* = *F. excelsior*, see text).

Fig. 4 (A) Correlogram of pairwise kinship coefficient (F_{ij}) estimator against distance classes (logarithmic scale). Sharp lines represent the 95%confidence intervals for the null hypothesis of complete spatial randomness of genotypes, obtained by 15000 permutations of spatial locations among individuals. (B, C) Correlograms of *Kcor* function for (B) flowering date and (C) DBH against distance classes (logarithmic scale). Light lines represent 95% confidence intervals for the null hypothesis of random spatial distribution, obtained by 1000 Monte-Carlo simulations. (D) Graphical representation of the spatial distribution of trees according to their floral phenology, obtained by kriging analysis (linear interpolation). White colour represents early flowering trees, and black colour represents late flowering trees. Different grey shades represent intermediate flowering individuals.

Table 1 Genetic diversity statistics and linkage disequilibrium

(A) Overall genetic diversity on the eight microsatellite loci in the adult population

	A	A_e	H_o	F_{IS}
M2-30	44	11.21	0.868	0.048**
FEMSATL 4	28	5.52	0.820	0.000
FEMSATL 8	30	11.07	0.844	0.074***
FEMSATL 10	31	10.93	0.698	0.233***
FEMSATL 11	34	12.21	0.900	0.022
FEMSATL 12	37	9.75	0.806	0.103***
FEMSATL 16	6	1.93	0.339	0.298***
FEMSATL 19	26	4.44	0.723	0.068**
Mean	29.5	8.38	0.750	0.095***
SD	11.1	3.85	0.180	0.032

A, number of alleles; A_e, effective number of alleles; H_o, observed heterozygosity;F_{IS}, Wright's inbreeding coefficient. Exact tests were performed with 15000 random permutations (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Standard deviation (SD) of F_{IS} was estimated with a jackknifing procedure over loci.

(B) Genetic diversity and linkage disequilibrium within and among phenological groups

	N	A	A_e	H_o	F_{IS}	N_{DL}
Group 1 (Early)	34	15.9	7.69	0.687	0.159***	0/28
Group 2	95	22.0	7.47	0.757	0.076***	0/28
Group 3	62	21.6	7.93	0.770	0.076***	9/28
Group 4	46	19.6	8.32	0.755	0.087***	0/28
Group 5 (Late)	32	17.1	9.46	0.754	0.122***	5/28
Total population	269	29.5	8.38	0.750	0.095***	17/28

***P < 0.001. N, number of individuals per group. N_{DL}, number of significant linkage disequilibria (see text).

Table 2 Number of re-assigned individuals (percentage) in phenological groups using the linear discriminant function based on multivariate genotypes.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	*N*
Group 1 (Early)	**34 (100)**	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	34
Group 2	0 (0)	**93 (97.9)**	2 (2.1)	0 (0)	0 (0)	95
Group 3	0 (0)	0 (0)	**62 (100)**	0 (0)	0 (0)	62
Group 4	1 (2.2)	0 (0)	1 (2.2)	**44 (95.6)**	0 (0)	46
Group 5 (Late)	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)	1 (3.1)	**30 (93.8)**	32

N, number of individuals per group.

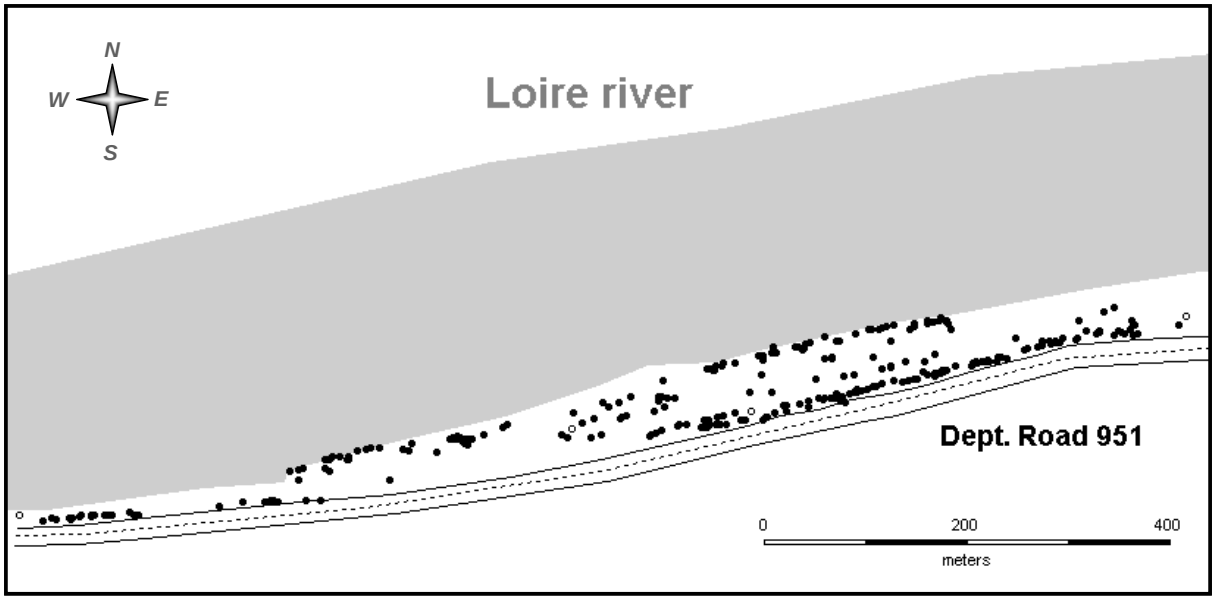
Table 3 Mean (standard error) of tree DBH, flowering and fruiting intensity over the two years of study, and floral gall attack intensity in 2003 within phenological groups

	Group 1 (Early)	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5 (Late)
DBH	111.85 (9.50)	92.44 (4.71)	77.03 (6.44)	78.80 (7.86)	54.53 (8.38)
Flowering intensity (2003)	1.50 (0.13) ^{a*}	2.65 (0.11) ^{b}	2.69 (0.12) ^{b}	2.52 (0.16) ^{b}	1.62 (0.19) ^{a}
Flowering intensity (2004)	2.32 (0.17) ^{a}	2.28 (0.09) ^{a}	1.80 (0.10) ^{b}	1.74 (0.12) ^{b}	1.72 (0.17) ^{b}
Fruiting intensity (2003)	0.65 (0.11) ^{a}	1 .54 (0.10) ^{b}	1.87 (0.13) ^{b}	1.83 (0.17) ^{b}	0.94 (0.21) ^{a}
Fruiting intensity (2004)	0.44 (0.10) ^{a}	0.92 (0.08) ^{b}	1.00 (0.12) ^{b}	0.93 (0.13) ^{b}	0.81 (0.18) ^{ab}
Gall attacks (2003)	0.35 (0.14) ^{ab}	0.27 (0.08) ^{a}	0.49 (0.13) ^{ab}	0.67 (0.17) ^{b}	0.53 (0.21) ^{ab}

*Multiple comparisons between groups using Dunn *post-hoc* tests: different letters denote significantly different means at the 5% level.

1 **Fig. 1**

2



3

Fig. 2

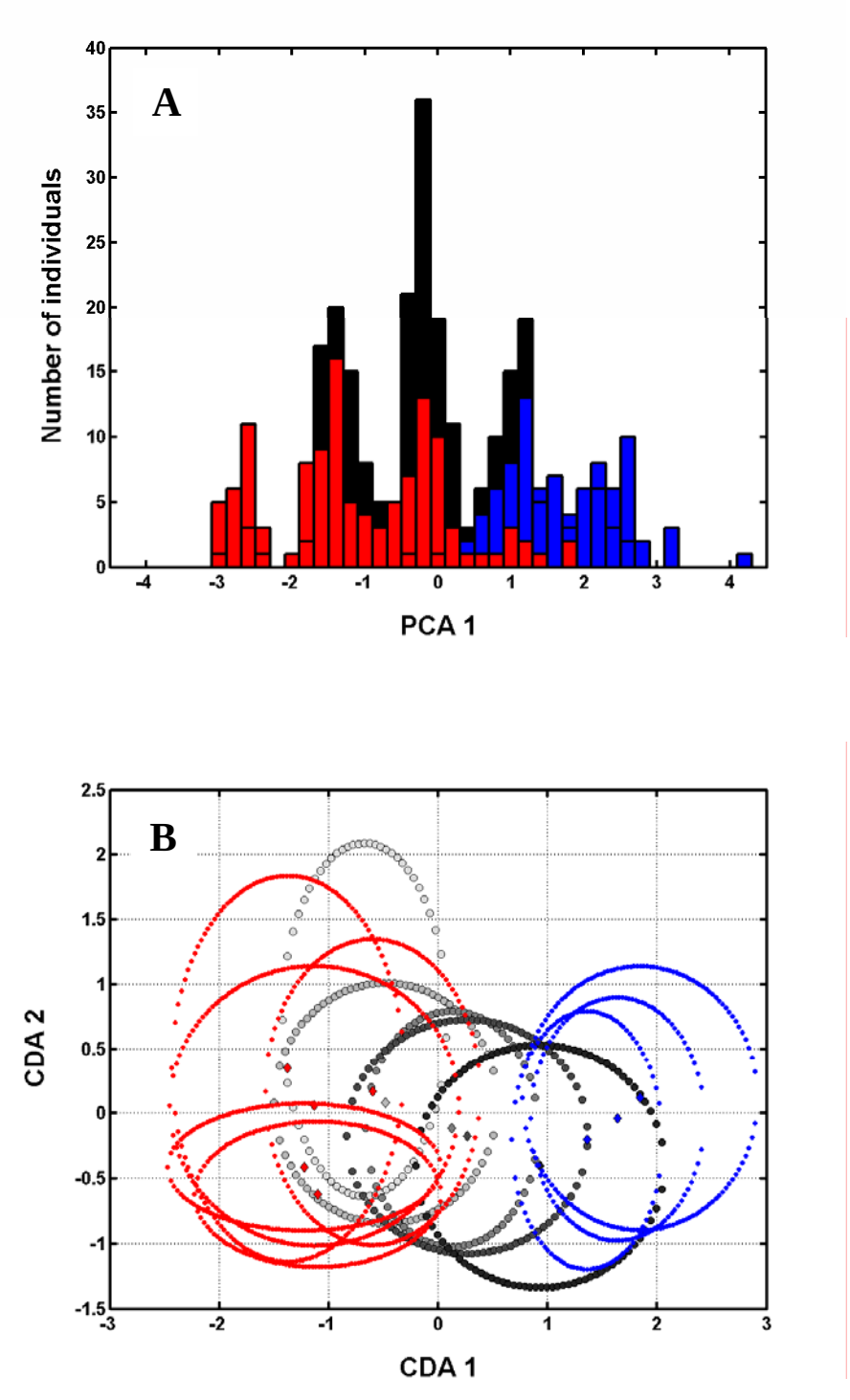


Fig. 3

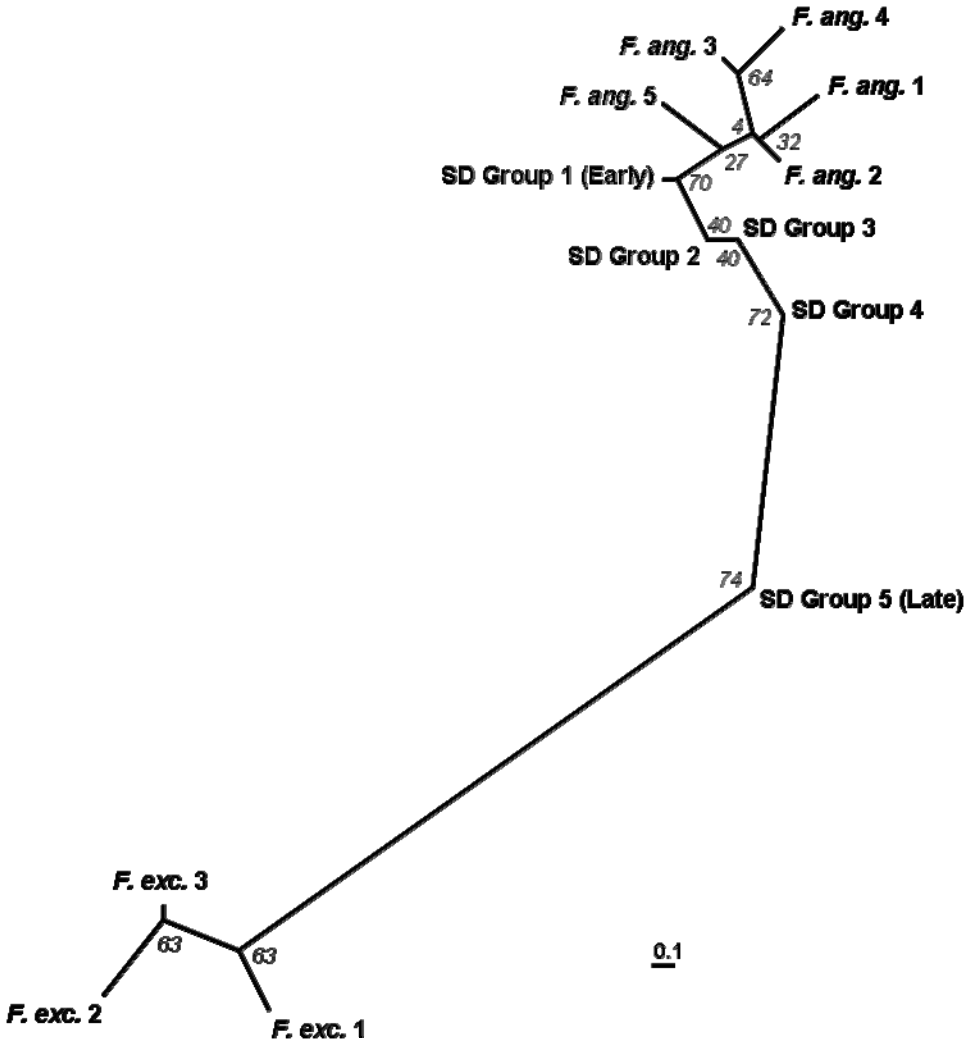
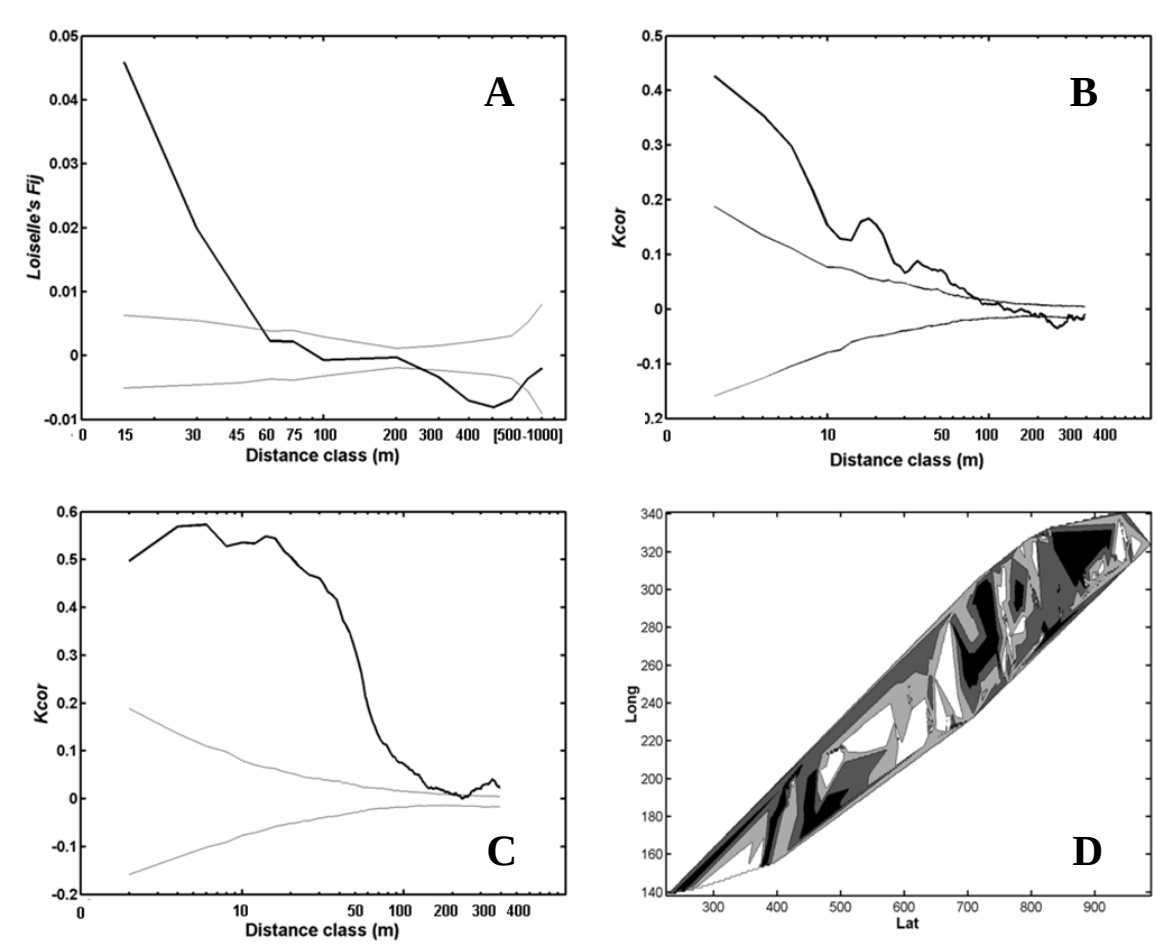

F. ang. 4
F. ang. 3
64
F. ang. 1
F. ang. 5
4
32
27
F. ang. 2
SD Group 1 (Early)
70
40
SD Group 3
SD Group 2
40
72
SD Group 4
74
SD Group 5 (Late)
F. exc. 3
63
63
0.1
F. exc. 2
F. exc. 1

Fig. 4


A
Loiselle's Fij
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
-0.01
0 15 30 45 60 75 100 200 300 400 [500-1000]
Distance class (m)
B
Kcor
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
0 10 50 100 200 300 400
Distance class (m)
C
Kcor
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
-0.2
0 10 50 100 200 300 400
Distance class (m)
D
Long
340
320
300
280
260
240
220
200
180
160
140
300 400 500 600 700 800 900
Lat

Supplementary material
Gérard PR, Fernandez-Manjarrés JF, Frascaria-Lacoste N

Table 1 Canonical Discriminant Analyses on morphological variables. Summary tables of CDA on four leaf morphological variables. The analysis was performed on 5 *F. angustifolia* populations, 4 *F. excelsior* populations and the 5 phenological groups of the St-Dyé population.

(A) Canonical Discriminant Analysis

Can. Var.	Can. Corr.	SE	EV	% cont.	Cumul.	LR	*F*-value	d.f.	$p > F$
1	0.719	0.023	1.0690	0.875	0.875	0.4271	8.20	52-1683	< 0.0001
2	0.300	0.023	0.0988	0.081	0.956	0.8631	1.83	36-1286	0.0022
3	0.183	0.029	0.0348	0.028	0.984	0.9483	1.07	22-872	0.3790
4	0.137	0.031	0.0191	0.016	1.000	0.9813	0.83	10-437	0.5971

Can. Var. = canonical variable. Can. Corr. = canonical correlation. SE = standard error. EV = Eigenvalue. % cont. = proportion of contribution of the variable explaining the total variation. Cumul. = cumulative proportion. LR = Likelihood ratio. d.f. = degrees of freedom.

(B) Correlations of canonical variables

Variable	Can1	Can2
min_leaflet	0.945124	-0.204124
max_leaflet	0.939909	-0.181136
width	0.442990	0.278055
length	0.235152	0.883984

Table 2. Canonical Discriminant Analyses on morphological variables. Summary tables of CDA on 12 morphological variables, performed on the 5 phenological groups of the St-Dyé population.

(A) Canonical Discriminant Analysis

Can. Var.	Can. Corr.	SE	EV	% cont.	Cumul.	LR	*F*-value	d.f.	$p > F$
1	0.598	0.042	0.5569	0.765	0.765	0.5449	3.08	48-864.9	< 0.0001
2	0.317	0.058	0.1116	0.153	0.918	0.8484	1.15	33-663.6	0.2559
3	0.200	0.062	0.0415	0.057	0.975	0.9430	0.67	20-452	0.8542
4	0.134	0.064	0.0182	0.025	1.000	0.9822	0.46	9-227	0.9014

(B) Correlations of canonical variables

Variable	Can1	Can2	Can3
bud_color	-0.318237	0.078183	-0.011509
bud_vert	-0.615804	-0.399269	0.219613
asratio_bpet	-0.388892	0.106969	-0.001801
asratio_dpet	-0.150847	0.563650	0.052033
asratio_ltot	-0.425543	0.257276	0.070023
teeth_nb	0.487155	0.252213	0.398863
med_lf	0.428994	-0.399129	0.169048
asratio_lf	-0.407352	0.063601	0.596045
med_df	-0.109959	0.359290	0.189147
asratio_df	-0.382478	-0.028853	0.547054
min_leaflet	0.733854	0.141719	0.072628
max_leaflet	0.724190	0.171768	0.081642

Prefix "as" represents the non-linear transformation 2*arcsin (√variable). bud_vert = quantity of 3-buds verticils. ratio_bpet = basal petiole length/leaf length. ratio_dpet = distal petiole length/distal leaflet length. ratio_ltot = leaf length/leaflet number. med_lf = position of the biggest lateral leaflet width along leaflet length. ratio_lf = lateral leaflet width/length. med_lf = position of the biggest distal leaflet width along leaflet length. ratio_lf = distal leaflet width/length.

Fig. 1 Un-rooted Neighbour-Joining tree based on the Mahalanobis D^2 distances between phenological groups, computed over the eight microsatellite loci. Black circle represent the late flowering group and white circle represent the early flowering group. Grey shaded circles represent intermediary flowering groups.

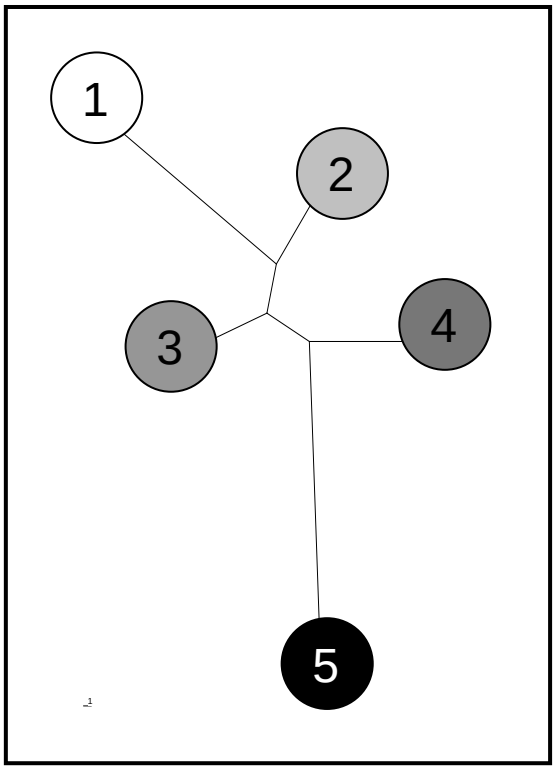
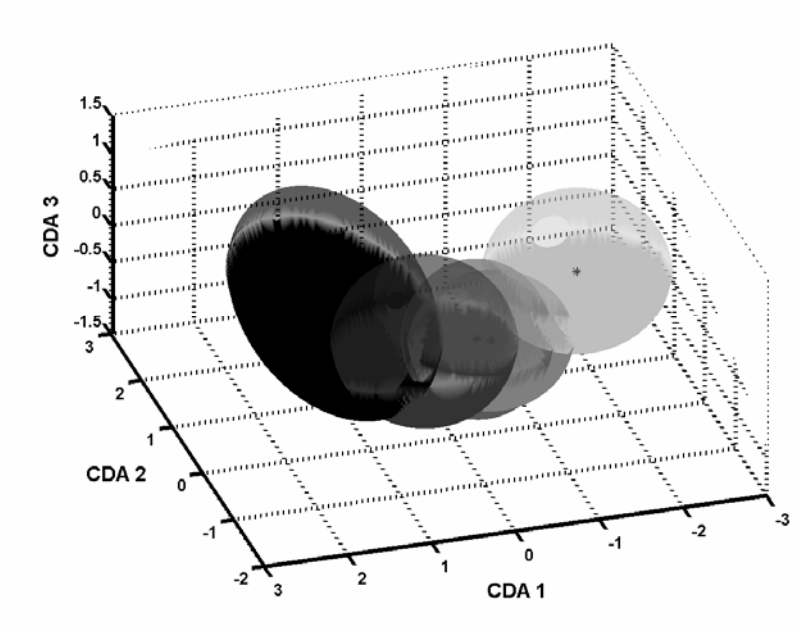


Fig. 2 Summary of the first three canonical variables in phenological groups (gradient of grey: light grey colour represents early flowering trees, and black colour represents late flowering trees): stars represent means of the populations or groups and ellipsoids represent standard deviations.



ASSORTATIVE MATING AND DIFFERENTIAL MALE MATING SUCCESS IN AN ASH HYBRID ZONE POPULATION

PIERRE R. GERARD[1,2], ETIENNE K. KLEIN[3,4], FREDERIC AUSTERLITZ[1,5], JUAN F. FERNANDEZ-MANJARRES[1,6] AND NATHALIE FRASCARIA-LACOSTE[1,7]

[1]*Laboratoire Ecologie, Systématique, Evolution, UMR ENGREF-CNRS 8079, Bât. 360, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France*

[2]*E-mail: pierre.gerard@ese.u-psud.fr*

[3]*Unité de Biométrie, INRA, Domaine St-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France*

Abstract. —The structure and evolution of hybrid zones depend mainly on the relative importance of dispersal and local adaptation, and on the strength of assortative mating. Here, we study the influence of dispersal, temporal isolation, variability in phenotypic traits and parasite attacks on the male mating success of both parental species and hybrids by contemporary gene flow analysis. We focused on a hybrid zone population between the two closely related ash species *Fraxinus excelsior* L. (common ash) and *F. angustifolia* Vahl (narrow-leaved ash), which is structured by flowering time, and where some intermediate flowering hybrids are widespread, suggesting favorable conditions for local adaptation. We jointly estimated the best-fitting dispersal kernel, the relative male fecundities relative to phenotypical traits and parasite attacks, and the strength of assortative mating due to differences in flowering phenology. In addition, we assessed the effect of accounting for genotyping error in these estimations. We detected a very high immigration rate and a fat-tailed dispersal kernel, counter-balanced by slight phenological assortative mating. We detected asymmetry of gene flow, with early flowering trees participating more as pollen donors than late flowering trees. Early intermediate flowering hybrids, which had the highest male mating success, showed optimal sex allocation which, with increasing selfing rates, can potentially confer a selective advantage in the zone.

Hybrid zones, where lineages differentiable by one or more heritable traits meet and intercross, provide unique opportunities for studying the nature and dynamics of barriers to gene exchange. The evolution of these barriers can have many different outcomes, including divergence of populations leading to speciation, collapse of differentiated populations, hybrid speciation or invasion. The structure and evolution of hybrid zones will mainly depend on the relative importance of dispersal, local adaptation and the fitness of hybrids (Arnold 1997; Barton 2001), influencing the strength of reproductive isolation. If dispersal remains important between adjacent populations, local adaptation should be sufficiently strong to prevent gene exchange between species through reduced fitness of hybrids. A particular ecological isolation process that can be the result of divergent adaptations and that cause by itself assortative mating is temporal isolation. It involves differences in reproductive time and can be the result of behavioral or developmental schedule divergences (Coyne and Orr 2004; Rundle and Nosil 2005). In this study we will mainly focus on the role of dispersal and temporal assortative mating in shaping the mating patterns in a plant hybrid zone population, and on the relative male fitness of hybrids and parental species.

In plants, pollen dispersal is an important factor influencing the dynamics and evolution of populations (e.g. Austerlitz et al. 2000; Oddou-Muratorio et al. 2003). The frequency of long-distance dispersal events can have strong effect on the distribution of genetic diversity by connecting distant demes in metapopulations (Klein et al. 2006): in contact zones, it can have great consequences by breaking down the genetic integrity of locally adapted populations and counter-balance the strength of selection. Several processes can limit gene flow despite long-distance dispersal, and thus increase the efficiency of response to selection. High selfing rates for example may preserve genetic integrity of well-adapted populations, but can generate inbreeding depression and reduce the effect of selection (Jarne and Charlesworth 1993; Cheptou et al. 2002; Goodwillie et al. 2005). In plants, temporal assortative mating is usually due to flowering time differences, which can also impede gene flow despite sympatry. If parental species are adapted to different habitats in parapatry, divergence in flowering time can be reinforced in the contact zone preventing gene flow and maladaptive hybridization, as shown for example in natural populations of *Agrostis tenuis* and *Anthoxanthum odoratum* at mine boundaries (McNeilly and Antonovics 1968) and for *A. odoratum* growing under different treatments in the 150-year old Park Grass Experiment (Silvertown et al. 2005). In contrast, if divergent flowering times are selected in allopatry by different environmental factors, they may overlap in sympatry if intermediate ecotones exist (Coyne and Orr 2004) or in the case of habitat disturbance (e.g. Lamont et al. 2003). If hybrids do not suffer of reduced

fitness, the only way to maintain temporal isolation is a variation of selection regimes through the reproductive season (Hendry and Day 2005). Indeed, as flowering times are often highly heritable, assortative mating due to flowering phenology can strongly influence the response to selection, for example increase the rate of response to directional selection (Fox 2003; Weis et al. 2005). Moreover, in the case of a strong temporal isolation, high selfing can provide reproductive insurance and thus contribute to maintain it.

In this context, local scale studies are useful to explore how interactions between selection, assortative mating and dispersal influence the structure and evolution of plant hybrid zones (Cruzan and Arnold 1994). In particular, cross-generational approaches using molecular markers have been useful to infer the strength of assortative mating in natural hybrid populations. Few recent studies have used methods such as paternity or mating system analyses to estimate the importance of assortment and/or differential mating successes in structuring hybrid zones of plants (e.g. Bacilieri et al. 1996; Cornman et al. 2004; Valbuena-Carabaña et al. 2005) or animals (e.g. Nürnberger et al. 2005). Detecting temporal assortative mating, i.e. the correlation in flowering time between pollen donors and recipients, can be accomplished at a local scale by paternity analysis (Weis 2005). Here we extend a recently developed mating model (Oddou-Muratorio et al. 2005) to estimate important parameters involved in the evolution of a hybrid zone population between two closely related forest tree species.

The two European ash species *Fraxinus excelsior* L. and *F. angustifolia* Vahl have separate distributions in France but occur in sympatry in several regions where they hybridize (Fernandez-Manjarrés et al. 2006), although they show completely disjoint flowering phenologies in allopatry (Raquin et al. 2002a; Jato et al. 2004). We previously showed that the extent of hybridization seems to be limited by climatic variations in some regions, but intermediate conditions provide ecotones where hybrids are widespread, such as the Loire valley (Fernandez-Manjarrés et al. 2006). A fine-scale study allowed us to show that a hybrid zone population from this region was mainly genetically structured by differences in flowering times, through isolation by time patterns (Gérard et al. 2006). Individuals with extreme phenologies were genetically and morphologically close to either parental species, whereas intermediate flowering individuals seemed to represent several hybrid classes that flowered throughout the season between the two species. Moreover, we showed that these intermediate flowering hybrids produced more flowers and fruits over the two years of study. If these high levels of flowering and fruiting reflect a higher fitness, we can expect that these hybrid genotypes will rapidly invade the zone, especially if assortative mating occurs. The

two parental species are known to be outcrossing species (e.g. Morand-Prieur 2003; Bacles et al. 2005; Fernandez-Manjarrés and Gérard, unpublished) but no data are available about the level of selfing in hybrids, which may be an important factor influencing their ability to spread out.

Our aim was to explore the relative importance of diverse forces influencing the evolution of this hybrid zone population by estimating jointly: (1) the pollen dispersal kernel and pollen immigration from outside the population, (2) the strength of temporal assortative mating, (3) the selfing rate within the population, (4) the relative male fitness through mating success of parental species and different intermediate flowering hybrids and the effect of different phenotypical trait variations on this success (i.e. sexual phenotype, flowering intensity, tree size and fruit production), and (5) the effect of floral parasite infection intensity. We also estimated the variation in selfing rates among phenological groups in order to assess the level of selfing in hybrids compared to the parental species. Additionally, we also study the impact of the genotyping error rate assumed in the method, since it can have a strong impact on the estimation of relative mating successes (Araki and Blouin 2005; Slavov et al. 2005).

MATERIALS AND METHODS

Focus Species and Sampling

Common ash (*F. excelsior* L.) and narrow-leaved ash (*F. angustifolia* Vahl.) are closely related species (Jeandroz et al. 1997) with different distributions across Europe: *F. angustifolia* has a Southern Mediterranean distribution, whereas *F. excelsior* occurs at Northerner latitudes. They are in sympatry in several regions in France, such as the Loire and Saône valleys (Picard 1983; Fernandez-Manjarrés et al. 2006). Both species are post-pioneer forest trees with a colonizing behavior and a discontinuous spatial distribution. They require abundant water, especially *F. angustifolia* which is often found at low altitudes in riparian forests, particularly in central France (Picard 1983; Marigo et al. 2000). Both are protogynous, although anther dehiscence occurs while the stigma is still receptive, and pollen and fruits are wind-dispersed. *Fraxinus excelsior* has a complex trioecious breeding system: sexual types vary across a continuum from pure male individuals to pure females, with all kinds of hermaphrodites in between (Wardle 1961; Binggeli and Power 1999; Morand-Prieur et al. 2003). Much less is known regarding the mating system of *F. angustifolia*, which rather seems to be an androdioecious species (Gérard et al. 2006). The species differ in their phenology: initiation of flowering occurs between mid-March and early April for *F.*

excelsior, and between mid-December and end of January for *F. angustifolia*, with more among-years variations (Raquin et al. 2002a; Jato et al. 2004).

The study site is an unmanaged, naturally regenerated population covering almost 7 ha, located at Saint-Dyé-sur-Loire (latitude 47° 39’ 10’’ N, longitude 1° 28’ 40’’ E, altitude 78 m), along the Loire river in central France, in a zone of sympatry between the two species. All details and a map of the stand are given in Gérard et al. (2006). The population was composed of 269 flowering adult trees, and we observed a unimodal distribution of flowering dates between the extreme phenologies of the two species (Gérard et al. 2006). All trees were assigned to one of five phenological groups according to their flowering date (i.e. bud flush, just before pollen offset). We also measured the diameter at breast height (DBH), and grouped them into five discrete classes (< 40 cm to > 160 cm, with 40 cm intervals). We finally measured two fitness components, the flowering and fruiting intensity (5-level class variables), as well as the intensity of floral gall attacks (5-level class variable) and we recorded the sexual type of each individual (assigned to one of four classes: MM, MH, HM, HH, respectively for pure males and three types of hermaphrodites, the first letter representing the quantitatively dominant flower type). No female tree was present in the population.

We harvested 432 seeds on 27 fruiting trees (16 seeds per tree) in autumn 2003. The distances between the sampled mother trees ranged from 14 to 1775 m, with a mean of 538 m. We tried to sample individuals of each phenological group, but early flowering trees (first group) did not produce sufficient numbers of fruits. Seeds were rehydrated and sterilized as described in Raquin et al. 2002b), and embryonic tissues were dehydrated in a 1:1 ethanol-acetone solution. Total DNA was extracted from dried tissues using a DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen).

All flowering individuals and all seeds were genotyped at eight microsatellite loci: M-230, FEMSATL 4, 8, 10, 11, 12, 16 and 19 (Brachet et al. 1999; Lefort et al. 1999), under conditions described in Morand et al. 2002) and Gérard et al. (2006). The theoretic exclusion probability over the eight loci was 0.9995 for the 269 flowering adult trees.

Mating Model Analysis

Paternity analysis based on molecular markers is a powerful mean to infer dispersal events and assess mating patterns. In addition, it is possible to take account of the heterogeneity in male fecundity by estimating the effect of ecological and/or phenotypic variables on male mating success (MMS, i.e. the relative number of offspring sired by each male): for example the effect of floral phenotype (Elle and Meagher 2000), the effect of the inflorescence

morphology (Smouse et al. 1999) or the effect of floral phenology (Burczyk and Prat 1997). Here we adapted a mating model developed by Oddou-Muratorio et al. (2005), related to the neighborhood model (Adams and Birkes 1991; Burczyk and Koralewski 2005). The method is based on fractional assignment, which avoids attributions of wrong and loss of true paternities (for a review see Jones and Ardren 2003), and allows to estimate dispersal and mating system parameters, as well as male mating success parameters.

Modeling pollen clouds

The model considers that each offspring o sampled on mother j_o can result either from: (1) self-fertilization (with probability s), (2) cross-pollination by a male located outside the study population (with probability m), or (3) cross-pollination by a male sampled within the study area (with probability 1- m- s).

The probability that an offspring o of mother j_o results from self-fertilization and has genotype g_o depends on inheritance probabilities only:

$$P_{self}(o, j_o) = sT(g_o | g_{j_o}, g_{j_o}) \quad (1)$$

where $T(g_o | g_{j_o}, g_{j_o})$ is the Mendelian segregation probability (Meagher 1986) of the offspring genotype g_o given the mother genotype g_{j_o}.

The probability that an offspring o of mother j_o results from cross-pollination by a male located outside the study area, and is of genotype g_o, depends on the allelic frequencies in the "outside" populations as follows:

$$P_{outside}(o, j_o, AF) = mT(g_o | g_{j_o}, AF) \quad (2)$$

where AF corresponds to the allelic frequencies in the pollen cloud entering the study population. The external allele frequencies are inferred from the retrieved paternal gametes of all offspring having no compatible male parent within the study population, using the software MLTR 3.0 (Ritland 2002).

The probability that an offspring o of mother j_o results from crosspollination by a male l sampled within the set F of males occurring in the study population, and has the genotype g_o, depends on the contribution of this male to the pollen cloud as follows:

$$P_{inside}(o, j_o, F) = (1 - m - s) \sum_{l \in F} \pi_{j_o, l}(\theta_d, \mathrm{F}, \mathrm{G}) T(g_o | g_{j_o}, g_l) \quad (3)$$

where π_{jk} (θ_d, F, G) is the expected proportion of pollen emitted by male k in the local pollen cloud fertilizing female j; θ_d is a vector of dispersal parameters, F is a vector of fecundity parameters for all phenotypic classes of males (including parasite attack intensity). In addition

to Oddou-Muratorio et al. (2005), we included here a set G composed of the probability of mating between flowering classes (see below). The proportion π_{jk} thus depends (1) on the spatial location of trees (dispersal), via the probability p_{jk} that a pollen grain emitted by male k travels to mother j, (2) on the phenotypic variables, via the fecundity function Φ_k of male k and (3) on flowering phenology (assortative mating) via the probability γ_{kj} that a pollen grain is emitted by male k when the ovules of mother j are receptive. This yields:

$$\pi_{jk} = \frac{\Phi_k \gamma_{kj} p_{jk}}{\sum_{l \in F_M} \Phi_l \gamma_{lj} p_{jl}} \quad (4)$$

Model for the dispersal kernel.—We modeled pollen dispersal using a dispersal kernel $p(.;x,y)$ that describes the probability that a pollen grain emitted in (0,0) will participate to the pollen cloud fertilizing a tree in (x,y) (Austerlitz et al. 2004; Klein et al. 2006). We used the family of exponential power functions:

$$p(\theta_d; x, y) = \frac{b}{2\pi a^2 \Gamma(2/b)} \exp\left[-\left(\frac{\sqrt{x^2 + y^2}}{a} \right)^b \right] \quad (5)$$

where Γ is the gamma function (Abramowitz and Stegun 1964). θ_d includes the parameters a and b for an exponential power dispersal kernel, but only a for a Gaussian or exponential dispersal kernel (b is set at 2 or 1 respectively, Austerlitz et al. 2004). The shape parameter b affects the tail of the dispersal function and the scale parameter a is homogeneous to a distance (Clark 1998). The mean distance δ traveled by a pollen grain under the kernel $p(a,b)$ is given by:

$$\delta = a \frac{\Gamma(3/b)}{\Gamma(2/b)} \quad (6)$$

For $b < 1$, the dispersal kernel is fat-tailed (Clark 1998), i.e. the long-range decrease is slower than for an exponential of the distance, so that the probability of long-distance dispersal events increases. For $b > 1$ (e.g. $b = 2$ for the Gaussian model), the dispersal is thin-tailed, which implies much less long-distance dispersal events. For $1 < b < 2$, the dispersal kernel is leptokurtic (i.e. a distribution with a high peak and less long-distance events than the Gaussian one) and it is platykurtic for $b > 2$ (i.e. a flat-topped distribution) (see Austerlitz et al. 2004).

For each dispersal kernel, i.e. for each set of dispersal parameters $\theta_d = (a,b)$, the probability p_{jk} that a pollen grain emitted by male k travels to mother j (see equation (4)) is

given by $p_{jk}=p(\theta_d; x_k-x_j, y_k-y_j)$. We thus assume that pollen emitted by each sampled male tree disperses according to the same dispersal kernel $p(\theta_d; x, y)$.

Model for male fecundities.— Male fecundity was modeled following Oddou-Muratorio et al. 2005), and considering discrete classes for both phenotypic traits and gall attacks. If f_c^i is the relative fecundity of a male belonging to the *c*th class of a given trait *i*, the fecundity Φ_k of a male *k* is given by $f_{c(k)}^i$ where *c(k)* is the phenotypic class to which male *k* belongs. We did not consider any interaction effect between phenotypic traits and gall attacks: the fecundity of a male belonging to class *c(k)* of flowering intensity (trait 1) and suffering a level *e(k)* of gall attacks (trait 5) is thus simply: $\Phi_k = f_{c(k)}^1 * f_{e(k)}^5$. All relative fecundities f_c^i's of the different phenotypic classes of males are stored into the vector F.

Models for flowering phenology. —We modeled the flowering phenology in two different ways. Firstly (*model 1*), we modeled the relative flowering phenology considering the phenological differences between pollen-emitting (male) and pollen-receiving (female) trees to assess the strength of assortative mating. In that case, we define g_d as the relative male success of a tree at siring offspring on another tree when the phenological difference between the two trees is *d*. The relative male fecundity γ_{kj} of tree *k* on tree *j* is thus $g_{d(kj)}$, where *d(kj)* is the difference in phenology between tree *k* and tree *j*, *d(kj)* being null if the pollen-emitting and pollen-receiving flower simultaneously, positive if the emitting flowers before the receiving and negative otherwise. The set G contains all g_d's .

Secondly (*model 2*), we used the approach described above for other phenotypic traits to assess the overall relative male mating success of the different phenological groups on all mothers of the population. In that case, the vector G, containing the relative fecundities of the different phenological groups, is identical to F.

Joint estimation of the dispersal kernel, male fecundities and phenological assortative mating

We used a maximum likelihood approach to estimate jointly the vector of dispersal parameters (θ_d), the vector of the relative male fecundities of the different phenotypic classes and infection intensities (F), the vector of the relative fecundities of different classes of flowering time or flowering time differences (G), the selfing rate (*s*) and pollen immigration rate (*m*). The log-likelihood function of all observed progenies collected on females given the above model is given by:

$$\log L(\theta_d, \mathrm{F}, \mathrm{G}, s, m) = \sum_{o=1}^{O} \log\left[P_{self}(o, j_o) + P_{inside}(o, j_o, F) + P_{outside}(o, j_o, AF)\right] \qquad (7)$$

Equation (8) assumes that all fertilization events are independent.

Statistical analyses

All analyses described below were performed using Mathematica 5.0 (Wolfram Research Inc.). Notebooks are available upon request from PRG.

Fits.— All fits were achieved by maximizing the log-likelihood of equation (7) following a quasi-Newton algorithm. For the exponential power dispersal kernel parameters, we estimated δ and *b* rather than *a* and *b*. To ensure numerical convergence, parameters *m* and *s* were transformed through a logit function [$m=e^{m'}/(1+e^{m'})$ and $s=e^{s'}/(1+e^{s'})$] and male fecundity parameters were transformed through $f_{c(k)} = 10^{f'_{c(k)}}$.

Confidence intervals.—For δ and *b*, 95% likelihood-profile confidence intervals were derived by plotting contour plots of the likelihood function (Coles 2001). For vectors of parameters F and G (male fecundities and flowering phenology), and for parameters *m* and *s*, we derived 95% confidence intervals by computing the asymptotic Gaussian variance-covariance matrix, which is the inverse of the Fisher's information matrix (i.e. the opposite of the expectation of second-order partial derivatives of the log-likelihood function with respect to all couples of parameters) (Coles 2001). As these parameters were estimated through a transformation function, we first computed a symmetric Gaussian asymptotic interval for the transformed parameters (*m*', *s*' and *f*') by using a delta method (Coles 2001). We then obtained asymmetric confidence intervals for the parameters of interest (*m*, *s*, and *f*) by the reverse transformation of the bounds of the intervals.

Tests.—We tested for the effect of dispersal kernel, spatial and temporal non-random mating, and of the variation in phenotypic traits and gall attacks on the MMS, by building several corresponding nested models from equation 4 and using likelihood-ratio tests (LRT) in a type III approach (Oddou-Muratorio et al. 2005).

Effect of genotyping error

To account for possible genotyping error, we re-computed the Mendelian transition probabilities allowing an error of ± 1 microsatellite repeat unit for genotypes of all males at all loci (see Appendix). All models described above were then used with the modified log-

likelihood accounting for a fixed mistyping rate, either a low rate of 0.01%, or a relatively high rate of 2.5%.

Effective Male Population Density

Using male fecundities estimated as described above, we also estimated the reduction in effective male population density caused by heterogeneity in male fecundity under the complete model following Oddou-Muratorio et al. 2005). This density is defined by $d_{em} = N_{em}/A$, where N_{em} is the effective male population size (i.e. the inverse of the probability that two pollen grains come from the same male) and A is the area covered by the study population. The reduction in effective male population density can be expressed as:

$$\frac{d_{em}}{d_{obs}} = \frac{1}{N} \frac{\left(\sum_{k \in F} \left(\prod_{i=1}^{n} f_{c(k)}^{i} \right) \right)^2}{\sum_{k \in F} \left(\prod_{i=1}^{n} f_{c(k)}^{i\,2} \right)} \qquad (8)$$

where d_{obs} is the observed male population density, $f_{c(k)}^{i}$ is the fecundity of male k belonging to the c^{th} class of the phenotypic trait i, and n is the number of traits under consideration. We also estimated the reduction in effective male population density due to dispersal features and phenology, including in the above sums all p_{jk}'s and all $g_{d(kj)}$'s.

Estimation of Selfing Rates within Phenological Groups

We performed a mixed-mating model analysis, using the method of Ritland 2002) implemented in the software MLTR 3.0, to assess the variation in selfing rates relative to the flowering time. We first estimated the mean outcrossing rates t_m in each phenological group (from the second to the fifth) from multilocus genotypes of offspring harvested on the mother trees, using an EM algorithm. Standard errors were computed by performing 1000 bootstrap replicates using families as resampling units. We also estimated family-level t_m values (Ritland 2002).

RESULTS

Joint Estimation of the Dispersal Kernel, Temporal Assortative Mating and Male Fecundities

Dispersal kernel and immigration

The exponential power distribution provided a better fit than the normal or the exponential kernel and than panmixia. Notice however that the fit of the exponential power was not

significantly better than the exponential kernel without assuming genotyping error (Table 1). The estimated dispersal kernel was fat-tailed: the shape parameters ($\hat{b}$) were lower than 1 (Table 1). Assuming genotyping error rate of 0.1% or 2.5% decreased the estimates of the scale parameter of the Gaussian and exponential kernels leading to shorter dispersal distances. On the contrary, high genotyping error led to fatter-tailed exponential power kernel (i.e. with a smaller shape parameter *b*) and also to a greater mean dispersal distance (Table 1 and Fig. 2). The estimated immigration rates decreased when the rate of assumed genotyping errors increased (Table 1), but was still ~60% for the highest assumed error rate.

Temporal assortative mating

The complete *model 1*, which modelled relative flowering phenology, provided a significantly better fit than the model without any effect of relative phenology when accounting for genotyping error (Table 2). The highest reproductive successes were observed when males flowered slightly earlier than the trees they fertilize ($\hat{g}_{-1}$ and $\hat{g}_{-2} > g_0$) or when they belonged to the same phenological group (g_0, fixed here at 1). Relative male fecundities decreased as the pollen-receiving trees flowered earlier than the pollen emitting trees. The MMS on females that differed from 4 phenological groups (i.e. the MMS of either parental species on the other) were estimated at 0. Accounting for possible genotyping errors did not change substantially the range of values of $\hat{g}$, except for $\hat{g}_{-1}$ (Table 2).

Male mating success of phenological groups

The complete *model 2*, where the fertility of each phenological group was estimated over all pollen-receiving trees regardless of their flowering time, provided a significantly better fit than the model without any effect of phenology ($P < 0.01$, $P < 0.001$ and $P < 0.001$ respectively without, with low and with high rate of genotyping error). The estimated male fecundity was significantly higher for phenological group 2 than for all other groups, and the estimated fecundity of the "*F. excelsior*" group 5 was null without error (Fig. 1). All other parameters did not change compared to *model 1*.

Effect of phenotypic trait variations and gall attacks

Without or with a high rate of genotyping error, only flowering intensity and DBH had a significant effect on the relative male fecundities (Table3): male fecundities were higher for trees with larger DBH and with larger flowering intensities. With a low error rate, gall attacks,

in addition to DBH and flowering intensity, had a significant effect on the relative male fecundities (severely attacked trees had lower fecundities), while fruiting intensity had a marginally significant effect (*P*-value = 0.06, higher male fecundity for trees producing more fruits). The effect of the sexual type was never significant. The range of estimated relative fertilities did not change substantially when accounting for genotyping errors, except $\hat{f}_4$ for flowering intensity, $\hat{f}_3$ for gall attacks with high error and all fertilities for sexual type (particularly $\hat{f}_1$ corresponding to the relative fertility of males) (Table 3).

Male effective population density

For *model 1*, we estimated the reduction of effective male population density due to phenotypic traits only: $\hat{d}_{em} / d_{obs} = 0.32$ without accounting for genotyping error, $\hat{d}_{em} / d_{obs} = 0.24$ with low error rate, and $\hat{d}_{em} / d_{obs} = 0.27$ with high error rate.

The mean reduction of effective male population density due to phenotypic traits and temporal assortative mating was estimated to $\hat{d}_{em} / d_{obs} = 0.30$, 0.23 and 0.27 (without error, with low error and with high error respectively. Among mothers and with or without genotyping error, the highest reductions were estimated from the pollen clouds of mothers of the two latest phenological groups (4 and 5), and particularly of group 5 (almost two-fold decrease, results not shown).

Finally, the mean reduction of effective male population density due to phenotypic traits, temporal assortative mating and non-random dispersal was estimated to $\hat{d}_{em} / d_{obs} = 0.09$, 0.07 and 0.06 without error, with low error and with high error respectively.

Selfing Rates

The overall estimated selfing rate was 10% and was slightly affected by genotyping error (Table 1). The mean outcrossing rate estimates t_m varied among phenological groups (Fig. 3) and among families: t_m was significantly different from 1 within half of the families, with values varying between 0.31 and 0.88. The selfing rate was close to 20% in group 2 (t_m = 0.827, standard deviation = 0.077). In group 3, the selfing rate was estimated at 7% (t_m = 0.930, SD = 0.066): the family-level t_m values were significantly different from 1 within 3/8 families, varying between 0.625 and 0.94. The selfing rate was estimated at zero in the two latest flowering groups (4 and 5).

DISCUSSION

The aim of our study was to assess the relative importance of different forces influencing the evolution of this ash hybrid zone population, and to evaluate a component of fitness through the variability in male mating in parental species and hybrids. We will first discuss methodological aspects of our study, particularly the effect of accounting for genotyping errors. We will then discuss the role of dispersal, temporal assortative mating, and variation in selfing rates in the evolution of the population in the light of our results. Finally we will focus on the effect of phenotypic traits and parasite attacks on the MMS and on the functional gender of hermaphrodites in this population.

Methodological insights

According to Araki and Blouin 2005), assignment error can have a strong effect on the estimation of relative reproductive successes of different groups, particularly by increasing type II error (assignment of an untrue parent) when the proportion of unsampled parents is high. However, this type of error is difficult to avoid (Oddou-Muratorio et al. 2003). Here, we took account of genotyping error in a more realistic way than Marshall et al. 1998, who assumed that genotyping errors occurred for mother, offspring and candidate fathers, and that a mistyped allele could be of any size compared to the original allele. Indeed, we assumed no typing error for mother-offspring genotypes and we assumed that a genotyping error for father-offspring could be only of ±1 repeat unit, which is more realistic for microsatellite loci.

As expected, estimated parameter values varied when accounting for typing errors. However general trends were never modified by these errors: dispersal parameters were relatively stable, and the ranking of relative phenology parameters, as well as fertility parameters of various phenotypic trait classes, were barely affected, except for sexual type. The main difference laid in the significance of effects, which was certainly due to the increased information provided by genotyping errors. Given immigration values, the estimation obtained with typing errors may be more reliable than without errors.

The apparently unrealistic value of immigrant pollen pool estimated when typing errors are ignored illustrates a particular caveat of paternity analyses using microsatellite markers: higher allele numbers generally produce higher estimated immigration rates. Indeed, the apparent gene flow was estimated using paternity exclusion methods between 45% and 55% when using four loci, depending on the allele number, and increased up to 70% when using six loci (Gérard et al., unpublished results). Increasing the number of sampled alleles surely

improves the stringency of paternity analysis, but at the same time certainly increases the error rate.

Pollen Dispersal Features

Pollen immigration rate was very high, even accounting for typing errors, as expected for an anemophilous forest tree species: similar results were obtained for example in *Pseudotsuga menziesii* populations (Burczyk and Prat 1997), or in admixed populations of *Quercus robur* and *Q. petraea* (Streiff et al. 1999). Moreover, the best-fitting dispersal curve was a rather fat-tailed kernel. This feature appears to be frequent in plants including perennial herbs (e.g. Nurminiemi et al. 1998; Hardy et al. 2004), crops (e.g. Devaux et al. 2005) and forest trees (e.g. Austerlitz et al. 2004; Robledo-Arnuncio and Gil 2005). High immigration rate and fat-tailed dispersal can have strong consequences on the evolution of the hybrid zone by connecting remote populations, increasing local genetic diversity (Klein et al. 2006) and possibly counteracting the effect of local adaptation if assortative mating is not strong enough. If hybrids do not suffer reduced fitness, as suggested by their high frequencies in the population and their large flower and fruit productions (Gérard et al. 2006), long-distance pollen dispersal may contribute to produce rapidly a hybrid swarm. Nonetheless, the estimate of the shape parameter *b* of the exponential power kernel was not much smaller than 1 (the value for an exponential kernel) and the estimated mean dispersal distance was quite low ($100 < \hat{\delta} < 150$ m, depending of the typing error rate). These findings are consistent with a previous study we conducted in the same population showing that co-flowering trees were spatially patchy distributed (Gérard et al. 2006). Thus, a substantial number of reproductive events inside the stand may occur within these patches. Short-distance and long-distance dispersal are expected to have antagonistic effects: the former may produce pronounced spatial genetic patterns, as previously detected in this population (Gérard et al. 2006), but the latter may tend to connect distant populations, probably contributing to the creation and maintenance of a large-scale hybrid zone, as detected all along the Loire valley (Fernandez-Manjarrés et al. 2006).

Phenological Assortative Mating

The homogenizing effect of long-distance dispersal may be counteracted by temporal assortative mating. Even with incomplete assortative mating, a large part of inside-stand reproductive events occurred within the same phenological group when selfing is included, which may contribute to maintain isolation by time patterns (Gérard et al. 2006), and

potentially increase the rate of response to selection (Fox 2003; Weis et al. 2005). Indeed, it is worth noting that the estimated level of differentiation of pollen clouds among mothers, as computed with the TWOGENER method (see Smouse et al. 2001) was two-fold higher in the study population (Φ_{FT} = 0.11) than in a pure *F. excelsior* population (Φ_{FT} = 0.06, Morand-Prieur 2003), which could be due to non-random temporal sampling of pollen. Moreover, because of this temporal assortative mating, we can expect that, for each pollen-receiving tree, even long-distance pollen will be issued from trees flowering approximately at the same time.

But flowering phenology also generates asymmetrical gene flow, as indicated by higher relative MMS of a given tree on pollen-receiving trees flowering during the following month than on trees with earlier flowering. In our study population, the asymmetry may be favoured by the protogyny of the species: early flowering trees may participate to reproduction mainly as pollen donors, as it is shown by the relative MMS on later flowering females compared to the reciprocal. They may suffer a disadvantage in reproduction if they produce less seeds, which was the case over two years for *F. angustifolia* individuals from Group 1, probably due to higher susceptibility to late winter frosts in the Loire valley (Gérard et al. 2006). On the other hand, we can wonder how would evolve the invasive potential of *F. angustifolia* through hybridization in this region, in the case of climate change.

One of our main results is that we detected no inter-fertility between the parental species, as expected considering their phenologies. Thus, intermediate flowering hybrids could represent bridges to gene flow in the contact zone, as described for example for *Asclepias* species (Broyles 2002). However we can wonder how first productions of hybrids occurred in the zone when the two species first met. This could be due to exceptional events of hybridisation between the two species, which occur at a too low rate to be detected in our study. This could be due to exceptionally hard-winters, in which *F. angustifolia* individuals may have flowered much later than usual, as they require particular heat and chill conditions to flower (Jato et al. 2004), and thus flower that year at the same time as some *F. excelsior* individuals.

Selfing rates

High selfing rates can also contribute to counteract the homogenizing effect of long-distance dispersal, help to maintain temporal isolation and increase the success of well adapted genotypes if they do not suffer strong inbreeding depression. Indeed, it has been shown that a mutant exhibiting high selfing rates can invade locally stable outcrossing populations despite inbreeding depression (Porcher and Lande 2005). The relatively high rates

of self-fertilization of hybrids may provide them another advantage for colonizing the hybrid zone, as the parental species show very limited selfing. This was shown by Morand-Prieur 2003) and Bacles et al. 2005), and we had similar results on *F. angustifolia* (Fernandez-Manjarrés and Gérard, unpublished). Regarding *F. excelsior*, it seems to be due to post-zygotic self-incompatibility mechanisms because controlled self-fertilizations are possible but seeds abort before the complete development of the embryo (Raquin et al. unpublished results): however, these types of self-rejection mechanisms are not well-known (Barrett 1998). The occurrence of relatively high selfing rates within intermediate flowering groups is surprising. The hypothesis of pollen limitation can be excluded because the number of individuals and the mean flowering intensities were higher in the groups where high selfing rates were detected (Gérard et al. 2006). This is also supported by the reduction in effective male population density due to fertility parameters and phenology, which was less important in pollen clouds of mothers from group 2 and 3 ($\hat{d}_{em} / d_{obs}$ = 0.31 and 0.33 respectively). Moreover, mothers showing the highest selfing rates were not those that had the strongest reduction in effective pollination density (results not shown). A possible explanation may be a breakdown of epistasis in intermediate flowering hybrids, caused by linkage disequilibrium between alleles at loci involved in self-rejection mechanisms that co-evolved independently in the two species.

Differential Male Mating Success and Functional Gender

Male fitness of early flowering hybrids (Group 2) seemed to be higher than the other phenological groups, and with high levels of selfing, we can expect them to be able to rapidly colonize the zone if their female fitness is also high. On the other hand, *F. angustifolia* individuals (Group1) had a poor MMS during the year of study, probably for the same reasons for which they produce less fruits (higher susceptibility to late winter frosts). But variations of this MMS during climatic favourable years remain uncertain, as it seems that these individuals could contribute significantly to young seedling generations (Gérard et al. in preparation).

Some phenotypic traits that may participate in this higher MMS the tree diameter and the flowering intensity, as expected for wind-pollinated species (Klinkhamer et al. 1997), and also detected in other tree species (e.g. Oddou-Muratorio et al. 2005): the bigger and more intensively flowering trees the higher MMS. In this sense we found that intermediate flowering hybrids produced more flowers and had a big DBH (Gérard et al. 2006).

Moreover, trees producing a great quantity of seeds had also the highest relative MMS. Our results are consistent with classical predictions of sex allocation theory, i.e. a constant optimal sex allocation for simultaneous hermaphroditism, where individuals produce simultaneously male and female gametes (Charnov 1982; De Jong and Klinkhamer 2005). Nevertheless, many plant species seem to exhibit a gradual shift in sex allocation, then in functional gender, with increasing size (Klinkhamer et al. 1997; Campbell 2000; Cadet et al. 2004) and a positive correlation between male and female reproductive success was detected in very few cases (Broyles and Wyatt 1990; Devlin and Ellstrand 1990; Conner et al. 1996). Here we present another case where individuals with a high MMS also show a high female success. Further long-term work is needed to confirm what we observed in one population and during one year of study.

Surprisingly, we did not detect any effect of the sexual type on MMS: individuals with a majority of male flowers did not sire more seeds than perfect hermaphrodites. Thus MMS does not depend on the relative amount of male vs. hermaphrodite flowers. The very high relative MMS of pure males estimated here with a typing error rate confirm what was observed on controlled crosses in *F. excelsior* (Morand-Prieur et al. 2003). However, no sharp conclusion can be stated given the very low frequency of males in the population (2%).

If low rates of gall attacks seemed to have little effect on MMS, high rates strongly decreased the relative MMS. As gall mites (*Eriophyes fraxiniflora*) infect ash male flowers (Wardle 1961), it is expected that high attack levels would influence the relative MMS. Mite attacks may also participate in the observed asymmetry of gene flow since late flowering trees are more infected than early flowering trees (Gérard et al. 2006).

Hence, higher MMS in intermediate flowering hybrids, and particularly in early reproducers (Group 2), can be influenced by an optimal sex allocation and lower rate of parasite attacks.

Conclusions

Phenological assortative mating shapes the mating patterns in this hybrid zone population, where a great part of reproductive events occurs between co-flowering trees, and between trees for which the start of flowering differs of a month. Asymmetry of gene flow came from early flowering pollen donors into late flowering recipients. Parental species, represented by the extreme flowering phenotypes, do not exchange genes and gene flow seems to occur mainly within the intermediate phenological groups. These trees showed the highest male mating success. Thus high selfing rates and optimal sex allocation could give them a selective

advantage in the hybrid zone, where temporal assortative mating could contribute to increase the rate of response to selection. Howerer, further work is needed to assess the relative fitness of seeds produced by different types of individuals, either selfed or outcrossed. Moreover, as pollen dispersal seems to occur over large distances, a larger sampling effort is perhaps needed to get more accurate estimates of the dynamics of the metapopulation in this hybrid zone.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Louis Nowak for field assistance, and Céline Devaux, Sylvain Billiard, Emmanuelle Porcher for helpful discussions and comments on earlier versions of the manuscript. PRG received financial support from the French Ministry of Education and the French Institute for Biodiversity (IFB). This work was funded by the DGFAR (Ministry of Agriculture), IFB and European Union (RAP Project QLK5-2001-00631) grants to NFL and FA. JFFM benefited from post-doctoral fellowships from the EU and IFB.

LITERATURE CITED

Abramowitz, M., and I. A. Stegun. 1964. Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables. US Government Printing Office, Washington, DC.

Adams, W. T., and D. S. Birkes. 1991. Estimating mating patterns in forest tree populations. Pp. 157-172 *in* S. Fineschi, M. E. Malvolti, F. Cannata and H. H. Hattemer, eds. Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SPB Academic Publishing, The Hague, Netherlands.

Araki, H., and M. S. Blouin. 2005. Unbiased estimation of relative reproductive success of different groups: evaluation and correction of bias caused by parentage assignment errors. Mol. Ecol. 14:4097-4109.

Arnold, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York.

Austerlitz, F., C. W. Dick, C. Dutech, E. K. Klein, S. Oddou-Muratorio, P. E. Smouse, and V. L. Sork. 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. Mol. Ecol. 13:937-954.

Austerlitz, F., S. Mariette, N. Machon, P.-H. Gouyon, and B. Godelle. 2000. Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species. Genetics 154:1309-1321.

Bacilieri, R., A. Ducousso, R. J. Petit, and A. Kremer. 1996. Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of european oaks. Evolution 50:900-908.

Bacles, C. F. E., J. Burczyk, A. J. Lowe, and R. A. Ennos. 2005. Historical and contemporary mating patterns in remnant populations of the forest tree *Fraxinus excelsior* L. Evolution 59:979-990.

Barrett, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. Trends Pl. Sci. 3:335-341.

Barton, N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. Mol. Ecol. 10:551-568.

Binggeli, P., and J. Power. 1999. Gender variation in ash (*Fraxinus excelsior* L.). http://members.tripod.co.uk/WoodyPlantEcology/species/ash.htm.

Brachet, S., M. F. Jubier, M. Richard, B. Jung-Muller, and N. Frascaria-Lacoste. 1999. Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*. Mol. Ecol. 8:157-168.

Broyles, S. B. 2002. Hybrid bridges to gene flow: a case study in milkweeds (*Asclepias*). Evolution 56:1943-1953.
Broyles, S. B., and R. Wyatt. 1990. Paternity analysis in a natural population of *Asclepias exaltata*: multiple paternity, functional gender, and the "pollen-donation hypothesis". Evolution 44:1454-1468.
Burczyk, J., and T. E. Koralewski. 2005. Parentage versus two-generation analyses for estimating pollen-mediated gene flow in plant populations. Mol. Ecol. 14:2525-2537.
Burczyk, J., and D. Prat. 1997. Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. Heredity 79:638-647.
Cadet, C., J. A. J. Metz, and P. G. L. Klinkhamer. 2004. Size and the not-so-single sex: disentangling the effects of size and budget on sex allocation in hermaphrodites. Am. Nat. 164:779-792.
Campbell, D. R. 2000. Experimental tests of sex-allocation theory in plants. Trends Ecol. Evol. 15:227-232.
Charnov, E. L. 1982. The theory of sex allocation. Princeton University Press, Princeton, NJ.
Cheptou, P.-O., J. Lepart, and J. Escarre. 2002. Mating system variation along a successional gradient in the allogamous and colonizing plant Crepis sancta (Asteraceae). J. Evol. Biol. 15:753-762.
Clark, J. S. 1998. Why trees migrate so fast: confronting theory with dispersal biology and the paleorecord. Am. Nat. 152:204-224.
Coles, S. 2001. An Introduction to Statistical Modeling of Extreme Values. Springer-Verlag, London, UK.
Conner, J. K., S. Rush, S. Kercher, and P. Jennetten. 1996. Measurements of natural selection on floral traits in wild radish (*Raphanus raphanistrum*). II. Selection through lifetime male and total fitness. Evolution 50:1137-1146.
Cornman, R. S., J. M. Burke, R. A. Wesselingh, and M. L. Arnold. 2004. Contrasting genetic structure of adults and progeny in a Louisiana Iris hybrid population. Evolution 58:2669-2681.
Coyne, J. A., and H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
Cruzan, M. B., and M. L. Arnold. 1994. Assortative mating and natural selection in an *Iris* hybrid zone. Evolution 48:1946-1958.
De Jong, T. J., and P. G. L. Klinkhamer. 2005. Evolutionary Ecology of Plant Reproductive Strategies. Cambridge University Press, Cambridge, UK
Devaux, C., C. Lavigne, H. Falentin-Guyomarc'h, S. Vautrin, J. Lecomte, and E. K. Klein. 2005. High diversity of oilseed rape pollen clouds over an agro-ecosystem indicates long-distance dispersal. Mol. Ecol. 14:2269-2280.
Devlin, B., and N. C. Ellstrand. 1990. Male and female fertility variation in wild radish, a hermaphrodite. Am. Nat. 136:87-107.
Elle, E., and T. R. Meagher. 2000. Sex allocation and reproductive success in the andromonoecious perennial *Solanum carolinense*. II. Paternity and functional gender. Am. Nat. 156:622-636.
Fernandez-Manjarrés, J. F., P. R. Gérard, J. Dufour, C. Raquin, and N. Frascaria-Lacoste. 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *F. angustifolia* Vahl. (Oleaceae) in Eastern and Western France. Mol. Ecol. in press
Fox, G. A. 2003. Assortative mating and plant phenology: evolutionary and practical consequences. Evol. Ecol. Res. 5:1-18.

Gérard, P. R., J. F. Fernandez-Manjarrés, and N. Frascaria-Lacoste. 2006. Temporal cline in a hybrid zone population between *Fraxinus excelsior* L. and *F. angustifolia* Vahl. Mol. Ecol. in press

Goodwillie, C., S. Kalisz, and C. G. Eckert. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst. 36:47-79.

Hardy, O. J., S. C. González-Martínez, H. Fréville, G. Boquien, A. Mignot, B. Colas, and I. Olivieri. 2004. Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). I. Pattern of pollen dispersal. J. Evol. Biol. 17:795-806.

Hendry, A. P., and T. Day. 2005. Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. Mol. Ecol. 14:901-916.

Jarne, P., and D. Charlesworth. 1993. The evolution of the selfing rate in functionally hermaphrodite plants and animals. Ann. Rev. Ecol. Syst. 24:441-466.

Jato, V., F. J. Rodriguez-Rajo, N. Dacosta, and M. J. Aira. 2004. Heat and chill requirements of *Fraxinus* flowering in Galicia (NW Spain). Grana 43:217-223.

Jeandroz, S., A. Roy, and J. Bousquet. 1997. Phylogeny and phylogeography of the circumpolar genus Fraxinus (Oleaceae) based on Internal Transcribed Spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Mol. Phylogenet. Evol. 7:241-251.

Jones, A. G., and W. R. Ardren. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. Mol. Ecol. 12:2511-2523.

Klein, E. K., C. Lavigne, and P.-H. Gouyon. 2006. Mixing of propagules from discrete sources at long distance: comparing a dispersal tail to an exponential. BMC Ecol. 6:3.

Klinkhamer, P. G. L., T. J. de Jong, and H. Metz. 1997. Sex and size in cosexual plants. Trends Ecol. Evol. 12:260-265.

Lamont, B. B., T. He, N. J. Enright, S. L. Krauss, and B. P. Miller. 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. J. Evol. Biol. 16:551-557.

Lefort, F., S. Brachet, N. Frascaria-Lacoste, K. J. Edwards, and G. C. Douglas. 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). Mol. Ecol. 8:1075-1092.

Marigo, G., J.-P. Peltier, J. Girel, and G. Pautou. 2000. Success in the demographic expansion of *Fraxinus excelsior* L. Trees 15:1-13.

Marshall, T. C., J. Slate, L. E. B. Kruuk, and J. M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol. Ecol. 7:639-655.

McNeilly, T., and J. Antonovics. 1968. Evolution in closely adjacent plant populations. IV. Barriers to gene flow. Heredity 23:205-218.

Meagher, T. R. 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. Am. Nat. 128:199-215.

Morand-Prieur, M.-E. 2003. Evolution et maintien d'un système de reproduction polymorphe. Approche génétique et écologique de la polygamie chez le frêne commun, *Fraxinus excelsior* L. PhD Thesis. ENGREF Paris. 95 p.

Morand-Prieur, M.-E., C. Raquin, J. A. Shykoff, and N. Frascaria-Lacoste. 2003. Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). Am. J. Bot. 90:949-953.

Morand, M.-E., S. Brachet, P. Rossignol, J. Dufour, and N. Frascaria-Lacoste. 2002. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. Mol. Ecol. 11:377-385.

Nurminiemi, M., J. Tufto, N.-O. Nilsson, and O. A. Rognli. 1998. Spatial models of pollen dispersal in the forage grass meadow fescue. Evol. Ecol. 12:487-502.

Nürnberger, B. D., N. H. Barton, L. E. B. Kruuk, and T. H. Vines. 2005. Mating patterns in a hybrid zone of fire-bellied toads (*Bombina*): inferences from adult and full-sib genotypes. Heredity 94:247-257.
Oddou-Muratorio, S., M.-L. Houot, B. Demesure-Musch, and F. Austerlitz. 2003. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. Mol. Ecol. 12:3427-3439.
Oddou-Muratorio, S., E. K. Klein, and F. Austerlitz. 2005. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent–offspring analysis. Mol. Ecol. 14:4441-4452.
Picard, J.-F. 1983. A propos du frêne oxyphylle, *Fraxinus angustifolia* Vahl. Forêt-Entreprise 83:2-4.
Porcher, E., and R. Lande. 2005. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression under pollen discounting and pollen limitation. J. Evol. Biol. 18:497-508.
Raquin, C., S. Brachet, S. Jeandroz, F. Vedel, and N. Frascaria-Lacoste. 2002a. Combined analyses of microsatellite and RAPD markers demonstrate possible hybridisation between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl. For. Genet. 9:103-111.
Raquin, C., B. Jung-Muller, J. Dufour, and N. Frascaria-Lacoste. 2002b. Rapid seedling obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl.). Ann. For. Sci. 59:219-224.
Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using *n* independant loci. Heredity 88:221-228.
Robledo-Arnuncio, J. J., and L. Gil. 2005. Patterns of pollen dispersal in a small population of Pinus sylvestris L. revealed by total-exclusion paternity analysis. Heredity 94:13-22.
Rundle, H. D., and P. Nosil. 2005. Ecological speciation. Ecol. Letters 8:336-352.
Silvertown, J., C. Servaes, P. Biss, and D. Macleod. 2005. Reinforcement of reproductive isolation between adjacent populations in the Park Grass Experiment. Heredity 95:198-205.
Slavov, G. T., G. T. Howe, A. V. Gyaourova, D. S. Birkes, and W. T. Adams. 2005. Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. Mol. Ecol. 14:3109-3121.
Smouse, P. E., R. J. Dyer, R. D. Westfall, and V. L. Sork. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. Evolution 55:260-271.
Smouse, P. E., T. R. Meagher, and C. J. Kobak. 1999. Parentage analysis in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae): why do some males have higher reproductive contributions? J. Evol. Biol. 12:1069-1077.
Streiff, R., A. Ducousso, C. Lexer, H. Steinkellner, J. Gloessl, and A. Kremer. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. Mol. Ecol. 8:831-841.
Valbuena-Carabaña, M., S. C. González-Martínez, V. L. Sork, C. Collada, A. Soto, P. G. Goicoechea, and L. Gil. 2005. Gene flow and hybridization in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl.) in central Spain. Heredity 95:457-465.
Wardle, P. 1961. Biological flora of the British Isles. *Fraxinus excelsior* L. J. Ecol. 49:739-751.
Weis, A. E. 2005. Direct and indirect assortative mating: a multivariate approach to plant flowering schedules. J. Evol. Biol. 18:536-546.
Weis, A. E., J. Winterer, C. Vacher, T. M. Kossler, C. A. Young, and G. L. Le Buhn. 2005. Phenological assortative mating in flowering plants: the nature and consequences of its frequency-dependence. Evol. Ecol. Res. 7:161-181.

TABLE 1. Selfing rate (*s*), immigration rate (*m*) and pollen dispersal parameters estimated under models 1 and 2, and confidence intervals at 95% (IC). The quality of fit was evaluated through the log-likelihood (*L*) of the data set under each model, and tested by a Likelihood-Ratio Test (LRT) comparing fits under the nested model and the complete model (Equation 4) with Exp. Power kernel. *K* is the LRT statistics and d.f. the number of degrees of freedom. Values of mean dispersal distance estimates ($\hat{\delta}$) are expressed in meters.

Genotyping error	Dispersal distribution	-*L*	Parameter estimates				LRT		
			$\hat{m}$ [CI]	$\hat{s}$ [CI]	$\hat{b}$ [CI]	$\hat{\delta}$ [CI]	d.f.	*K*	*P*-value
Without	Normal	9590.3	**0.82** [0.78-0.85]	**0.10** [0.07-0.13]	-	**98** [80-135]	1	9.6	< 0.01
	Exponential	9586.1	**0.82** [0.78-0.85]	**0.10** [0.07-0.13]	-	**106** [74-164]	1	1.2	0.29
	Exp. power	9585.5	**0.82** [0.78-0.85]	**0.10** [0.07-0.13]	**0.63** [0.28-1.33]	**147** [90-1072]	-	-	-
	Spatial panmixia	9612.4	**0.81** [0.77-0.85]	**0.10** [0.07-0.13]	-	-	2	53.8	$< 10^{-10}$
Low	Normal	9565.5	**0.72** [0.67-0.76]	**0.11** [0.09-0.15]	-	**90** [72-105]	1	25	$< 10^{-5}$
	Exponential	9554.4	**0.72** [0.67-0.76]	**0.11** [0.09-0.15]	-	**84** [66-108]	1	2.8	0.098
	Exp. power	9553.0	**0.72** [0.67-0.76]	**0.11** [0.08-0.14]	**0.59** [0.41-1.02]	**119** [70-215]	-	-	-
	Spatial panmixia	9615.3	**0.73** [0.69-0.78]	**0.11** [0.09-0.15]	-	-	2	124.6	0
High	Normal	9207.5	**0.63** [0.58-0.67]	**0.12** [0.09-0.15]	-	**78** [68-98]	1	45.4	$< 10^{-10}$
	Exponential	9188.7	**0.63** [0.58-0.67]	**0.12** [0.09-0.15]	-	**84** [68-104]	1	7.8	< 0.01
	Exp. power	9184.8	**0.62** [0.57-0.67]	**0.12** [0.09-0.15]	**0.52** [0.38-0.86]	**140** [75-233]	-	-	-
	Spatial panmixia	9291.0	**0.62** [0.58-0.67]	**0.12** [0.09-0.15]	-	-	2	212.4	0

TABLE 2. Assortative mating parameters relative to phenology (*g*) estimated under complete model (Equation 4) with Exp. Power kernel, and confidence intervals at 95% (CI). Indices for parameter estimates indicates the difference in number of phenological groups between the two parents (Father-Mother). The effect of relative phenology was tested by removing it (i.e. temporal panmixia) and comparing to the complete model by a LRT.

Genotyping error	Parameter estimates									LRT		
	$\hat{g}_{-4}$	$\hat{g}_{-3}$ [CI]	$\hat{g}_{-2}$ [CI]	$\hat{g}_{-1}$ [CI]	g_0	$\hat{g}_{+1}$ [CI]	$\hat{g}_{+2}$ [CI]	$\hat{g}_{+3}$	$\hat{g}_{+4}$	d.f.	*K*	*P*-value
Without	**0**	**0.24** [0.06-0.96]	**1.15** [0.05-24.78]	**0.84** [0.12-5.97]	**1.00**	**0.55** [0.10-3.19]	**0.59** [0.03-10.77]	**0**	**0**	5	4.0	0.57
Low	**0**	**0.16** [0.02-1.30]	**1.44** [0.80-2.59]	**1.72** [0.92-3.19]	**1.00**	**0.35** [0.12-1.01]	**0.15** [0.02-1.02]	**0**	**0**	5	20.4	< 0.001
High	**0**	**0.17** [0.08-0.39]	**1.41** [0.12-16.16]	**1.55** [0.21-11.25]	**1.00**	**0.51** [0.21-1.26]	**0.07** [0.05-0.09]	**0**	**0**	5	37.0	$< 10^{-5}$

TABLE 3. Fertility parameters relative to phenotypic traits and gall attacks (*f*) estimated under complete model (Equation 4) with Exp. Power kernel. The effect of each factor was tested by removing the factor and comparing to the complete model with all factors by a LRT. Indices indicate different levels of each factor (Flowering and Fruiting intensities: 1 = Anecdotal, 2 = Low, 3 = Intermediate, 4 = Abundant, 5 = Massive; DBH: 1 = < 40 cm, 2 = < 80 cm, 3 = < 120 cm, 4 = < 160cm, 5 = > 200 cm; Gall attacks: 1 = Inexistent, 2 = Low, 3 = Intermediate, 4 = High, 5 = Massive; Sexual type: 1 = Pure males (MM), 2 = Hermaphrodites with a high proportion of male flowers (MH), 3 = Hermaphrodites with a low proportion of male flowers (HM), 4 = Pure hermaphrodites (HH).

Genotyping error	Phenotypical trait	Parameter estimates					LRT		
		$\hat{f}_1$ [CI]	$\hat{f}_2$ [CI]	$\hat{f}_3$ [CI]	$\hat{f}_4$ [CI]	$\hat{f}_5$ [CI]	d.f.	*K*	*P*-value
Without	Flowering intensity	**0.06** [0.01-1.11]	**0.34** [0.04-3.26]	**0.91** [0.10-8.02]	**0.63** [0.06-6.23]	**1.00**	4	12.6	< 0.05
	DBH	**0**	**0.21** [0.04-1.02]	**0.68** [0.20-2.30]	**1.31** [0.44-3.90]	**1.00**	3	24.2	$< 10^{-3}$
	Fruiting intensity	**0.47** [0.03-8.27]	**0.57** [0.05-6.19]	**0.30** [0.03-3.02]	**0.35** [0.03-3.47]	**1.00**	4	2.6	0.64
	Gall attacks	**1.00**	**1.56** [0.32-7.65]	**1.71** [0.52-5.61]	**0.41** [0.07-2.21]	**0**	3	5.0	0.18
	Sexual type	**0**	**1.00**	**0.97** [0.13-7.32]	**1.14** [0.16-8.33]	-	2	1.4	0.51
Low	Flowering intensity	**0.27** [0.07-1.02]	**0.53** [0.19-1.48]	**0.92** [0.35-2.43]	**1.72** [0.66-4.51]	**1.00**	4	16.0	< 0.01
	DBH	**0**	**0.28** [0.10-0.78]	**0.62** [0.24-1.58]	**1.39** [0.61-3.14]	**1.00**	3	34.4	$< 10^{-5}$
	Fruiting intensity	**0.10** [0.02-0.39]	**0.31** [0.12-0.85]	**0.16** [0.05-0.48]	**0.22** [0.08-0.58]	**1.00**	4	9.2	0.06
	Gall attacks	**1.00**	**2.21** [0.80-6.15]	**2.48** [1.13-5.45]	**0.90** [0.29-2.76]	**0**	3	8.2	< 0.05
	Sexual type	**12.01** [1.12-128.30]	**1.00**	**1.14** [0.31-4.20]	**0.84** [0.24-2.97]	-	3	2.2	0.54
High	Flowering intensity	**0.18** [0.04-0.79]	**0.35** [0.10-1.27]	**0.84** [0.26-2.78]	**1.67** [0.50-5.63]	**1.00**	4	35.2	$< 10^{-5}$
	DBH	**0.03** [0.01-0.28]	**0.34** [0.15-0.79]	**0.84** [0.41-1.75]	**1.24** [0.62-2.50]	**1.00**	4	44.0	$< 10^{-5}$
	Fruiting intensity	**0.28** [0.05-1.54]	**0.71** [0.20-2.47]	**0.37** [0.11-1.26]	**0.49** [0.15-1.62]	**1.00**	4	7.8	0.10
	Gall attacks	**1.00**	**2.16** [0.76-6.18]	**1.71** [0.85-3.47]	**1.50** [0.71-3.17]	**0.60** [0.07-5.22]	4	4.0	0.43
	Sexual type	**12.38** [0.82-186.18]	**1.00**	**1.61** [0.21-12.64]	**1.34** [0.17-10.39]	-	3	5.4	0.15

FIG. 1. Estimates of relative fecundities of phenological groups, with or without accounting for genotyping error.

FIG. 2. Log-plot of dispersal kernels estimated under the Gaussian (dotted lines), exponential (dashed lines) and exponential power (plain lines) models, without error rate (black) and with low error rate (dark grey) and high error rate (soft grey). All kernels were estimated under the complete model (model 1).

FIG. 3. Outcrossing rates t_m estimated from family arrays sampled on mothers from each phenological group (2 to 5). Standard errors were computed from 1000 bootstrap replicates over families.

FIG. 1

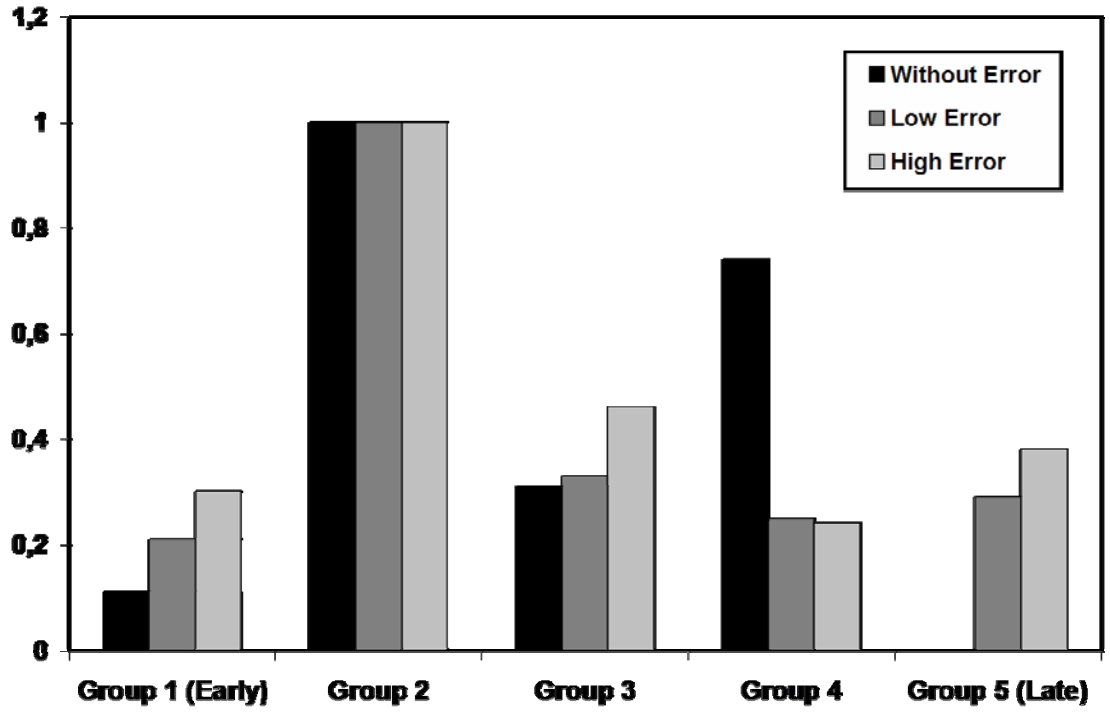


FIG. 2

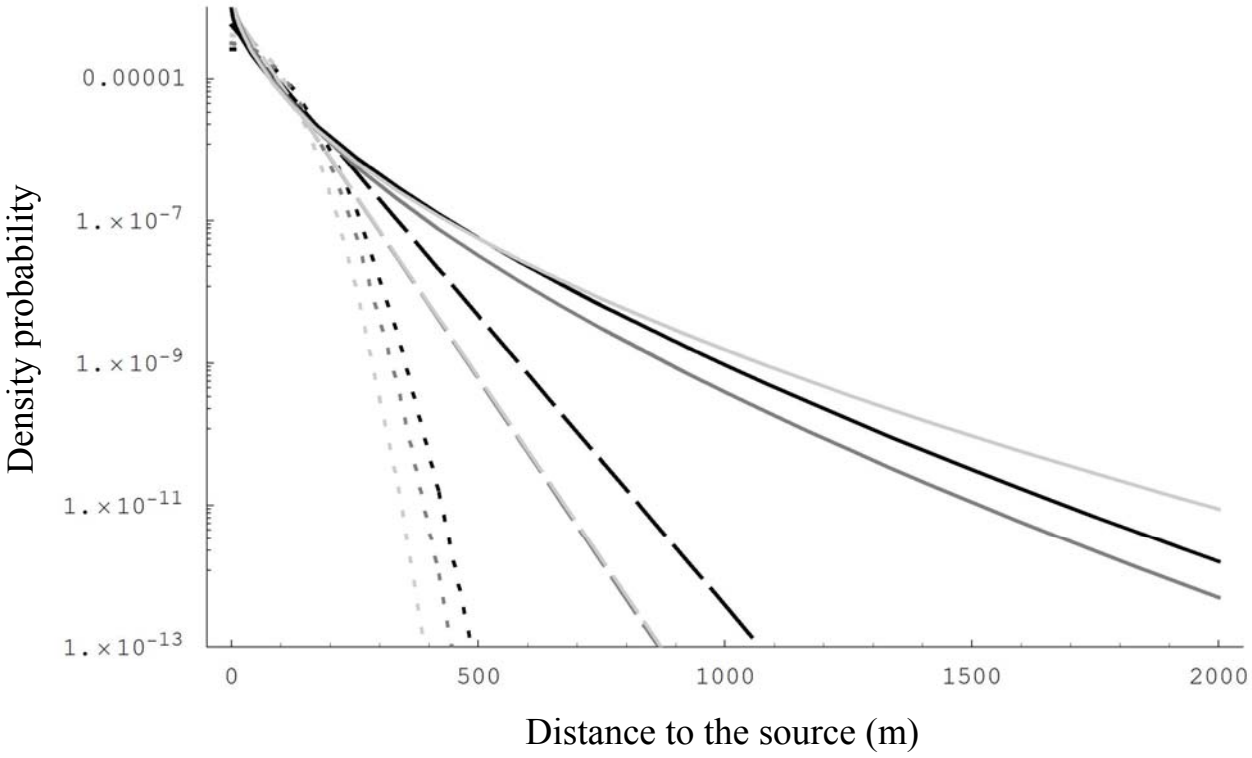
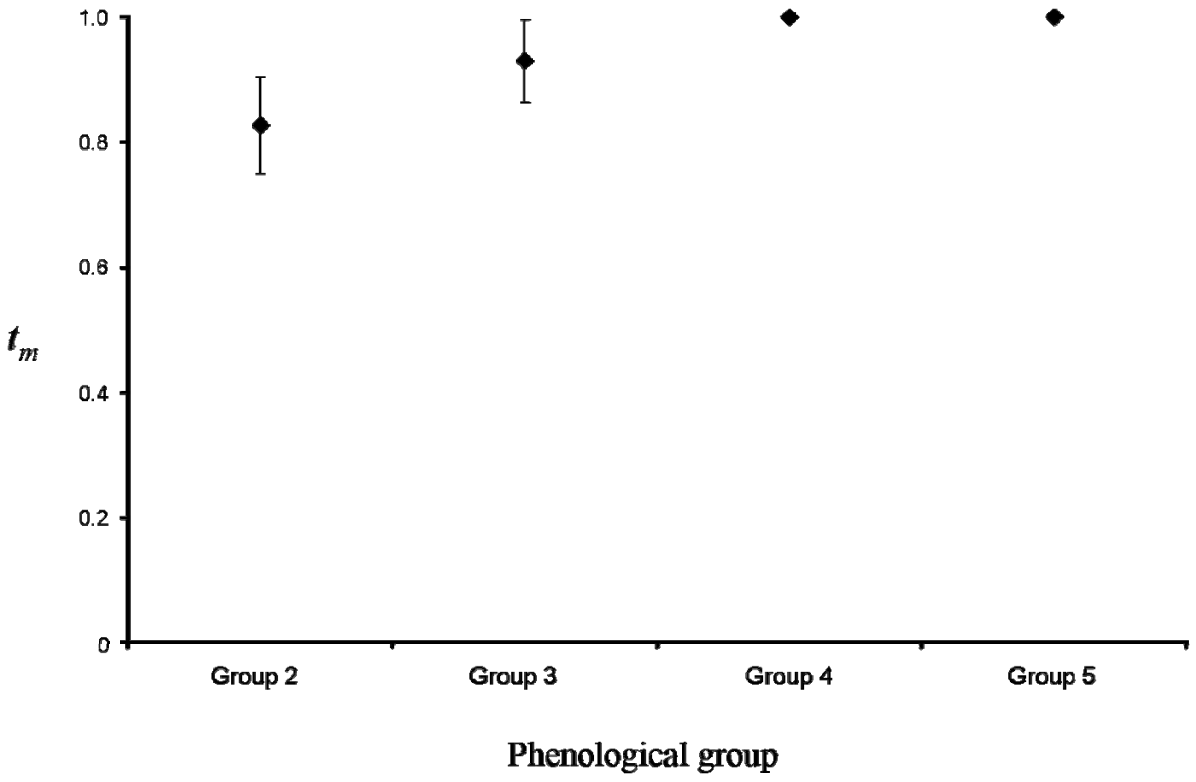

Density probability
0.00001
1.×10^-7
1.×10^-9
1.×10^-11
1.×10^-13
0
500
1000
1500
2000
Distance to the source (m)

FIG. 3


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
t_m
Group 2
Group 3
Group 4
Group 5
Phenological group

APPENDIX.

Modelling the genotyping error rate

If α was the error rate and if the paternal allele of the offspring was unambiguously known, we assigned as father with a probability α, a male homozygous for an allele that differ of 1 repeat unit from the offspring, and with a probability 1-2α, a male homozygous for the same allele.

This means that in equation 8, the standard transition probabilities $T(g_o|g_{j_o},g_l)$ defined by Meagher (1986) were replaced by $T(g_o|g_{j_o},g_l)=\prod_{loci} T_{loc}(g_{o,loc}|g_{j_o,loc},g_{l,loc})$, where for each locus *loc*, and with the notations from Ritland (2002):

$$T_{loc}\left(\{o_1,o_2\}|\{m_1,m_2\},\{f_1,f_2\}\right)=\frac{D_{o_1}^{m_1m_2}\tilde{D}_{o_2}^{f_1f_2}+D_{o_2}^{m_1m_2}\tilde{D}_{o_1}^{f_1f_2}}{\left(1+\delta_{o_1o_2}\right)},$$

with δ_{ij}=1 if i=j and 0 if i≠j, $D_o^{m_1m_2}=\left(\frac{\delta_{om_1}+\delta_{om_2}}{2}\right)$ is the mendelian contribution from the mother, without any mistyping, and the contribution from the father accounting for possible mistyping:

$$\tilde{D}_o^{f_1f_2}=\left(\frac{(\alpha\delta_{of_1+1}+\alpha\delta_{of_1-1}+(1-2\alpha)\delta_{of_1})+(\alpha\delta_{of_2+1}+\alpha\delta_{of_2-1}+(1-2\alpha)\delta_{of_2})}{2}\right)$$

Discussion

Nous avons donc montré qu'à échelle locale, une population hybride était non seulement structurée spatialement, mais également temporellement. L'hybridation entre les deux espèces semble n'être aucunement mal adaptative dans cette population et a produit une variation génétique clinale temporelle. De fait, ce décalage de phénologie florale au cours de la saison semble produire un certain degré d'homogamie par rapport à la date de floraison. D'ailleurs les croisements préférentiels semblent se faire par voie de conséquence entre individus se ressemblant morphologiquement, pouvant être du à l'existence de corrélation génétique entre la phénologie et plusieurs caractères morphologiques (voir par exemple Weis 2005). L'évaluation du degré de croisements préférentiels pourrait d'ailleurs certainement être affinée en suivant le déroulement de la floraison de chaque arbre au cours de la saison (Fox 2003; Weis et al. 2005), ce qui nécessiterait cependant des moyens logistiques assez importants. Mais en effet, il semble que certains arbres fleurissant tôt puissent ralentir temporairement leur floraison si les conditions climatiques se durcissent, par exemple en cas de gel tardif (obs. pers.), ce qui pourrait expliquer le taux relativement important de pollinisations sur des mères fleurissant plus de 15 jours après le mâle.

D'autre part, nous avons peu d'information sur les taux de survie des graines des différents groupes phénologiques et des deux espèces. Nous avons pu mettre en évidence des différences de d'intensité de dormance (voir chapitre 1) mais nous ne savons pas si les graines plus dormantes de *F. excelsior* ont des plus fort taux de survie que celles de *F. angustifolia*. En effet, certains lots de graines peuvent être très fortement attaquées par des insectes phytophages et/ou des champignons pathogènes (Gérard et Raquin, résultats non publiés), ce qui peut réduire fortement les taux de survie des graines.

Enfin, au vu de ces résultats, il apparaît que les individus fleurissant tôt sont moins infectés par les gales florales que les individus fleurissant tard. Il est souvent prédit que les insectes herbivores attaquent préférentiellement les plantes mâles que les plantes femelles, ces dernières investissant plus d'énergie à la reproduction et à la défense. Ce phénomène pourrait donc avoir un rôle important dans l'évolution vers la dioécie à partir de l'hermaphroditisme (Ashman 2002), comme cela pourrait être le cas par exemple chez l'érable *Acer opalus* (Verdú et al. 2004). Il pourrait être intéressant de comparer les taux d'infection par les gales au sein de populations de *F. angustifolia* et de *F. excelsior* en allopatrie. Chez les frênes il semble provoquer une diminution de fitness des mâles, les acariens attaquant la fleur mâle en

elle-même, ce qui aurait pu contribuer à l'évolution vers la trioécie chez *F. excelsior* s'il est plus infecté que *F. angustifolia.*

RÉFÉRENCES

Ashman, T.-L. 2002. The role of herbivores in the evolution of separate sexes from hermaphroditism. Ecology 83:1175-1184.

Fox, G. A. 2003. Assortative mating and plant phenology: evolutionary and practical consequences. Evol. Ecol. Res. 5:1-18.

Hendry, A. P. & T. Day. 2005. Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. Mol. Ecol. 14:901-916.

Verdú, M., P. Garcia-Fayos & G. Gleiser. 2004. Mites attack males of the sexually polymorphic tree *Acer opalus* more harmfully and more often. Functional Ecology 18:592-597.

Weis, A. E. 2005. Direct and indirect assortative mating: a multivariate approach to plant flowering schedules. J. Evol. Biol. 18:536-546.

Weis, A. E., J. Winterer, C. Vacher, T. M. Kossler, C. A. Young & G. L. Le Buhn. 2005. Phenological assortative mating in flowering plants: the nature and consequences of its frequency-dependence. Evol. Ecol. Res. 7:161-181.

CHAPITRE 4

DYNAMIQUE D'UNE POPULATION DE ZONE HYBRIDE

Les précédents travaux ont permis de montrer l'existence d'un certain degré d'isolement reproducteur par le temps de floraison et de longues distances de dispersion polliniques qui peuvent avoir de fortes conséquences sur le succès de ces arbres fleurissant tôt dans la saison mais plus tard que *F. angustifolia* (Groupe 2). L'objectif suivant consistait donc à savoir, par le génotypage d'un ensemble de semis présents dans la population de Saint-Dyé, si la contribution génétique de ces mêmes individus à quelques générations suivantes était encore supérieure. Ceci peut donc permettre d'évaluer le succès reproducteur réalisé en population naturelle, après la dispersion des graines, la germination et le début de croissance des semis, qui peuvent être des étapes importantes de sélection. Par exemple, si la dépression de consanguinité est forte, il est fort probable que la contribution du groupe 2 sera plus faible qu'attendue étant donné leur succès reproducteur mâle supérieur. Par ailleurs, ceci peut permettre d'évaluer le succès reproducteur femelle des individus de la population, ainsi que les distances de dispersion des graines par des analyses de parenté.

Nous avons donc cherché à savoir : (1) si la structure spatiale au sein des semis était conservée comparée à celle des adultes, (2) quelle est la contribution génétique de chaque groupe phénologique aux générations suivantes et (3) quelles sont les femelles ayant un fort succès reproducteur réalisé et quelles sont les distances de dispersion des graines ?

Nous avons donc génotypé 344 semis présents sur la parcelle d'étude (Figure 6) sur les huit loci microsatellites précédemment décrits (voir Chapitre 3). Les paramètres de diversité génétique et le coefficient de consanguinité (F_{IS}) ont été estimés avec FSTAT (Goudet 1995). La diversité génétique au sein des semis est très proche de celle observée chez les adultes. L'estimation du F_{IS} montre encore une fois l'existence d'un fort déficit en hétérozygotes, de même grandeur que celui détecté chez les adultes (Tableau 1, Chapitre 3). L'auto-corrélation spatiale menée sur les semis (SPAGeDi, Hardy & Vekemans 2002) donne des résultats également très proches de ceux obtenus sur les adultes : la classe de distance à laquelle le coefficient de parenté s'annule est la même (Figure 7, Chapitre 3). L'estimation des flux de gènes historiques ($\hat{\sigma}$ = 57 m) ne varie pas beaucoup et l'on observe donc la même structure spatiale au sein de deux cohortes d'âges très différents. Ceci dit, les semis échantillonnés n'étaient en général pas en première année de croissance et les principaux effets de la compétition doivent être détectables au moment de la germination. On peut supposer qu'une grande partie de ces semis survivra jusqu'à l'âge adulte, la majorité d'entre eux poussant d'ailleurs en milieu ouvert.

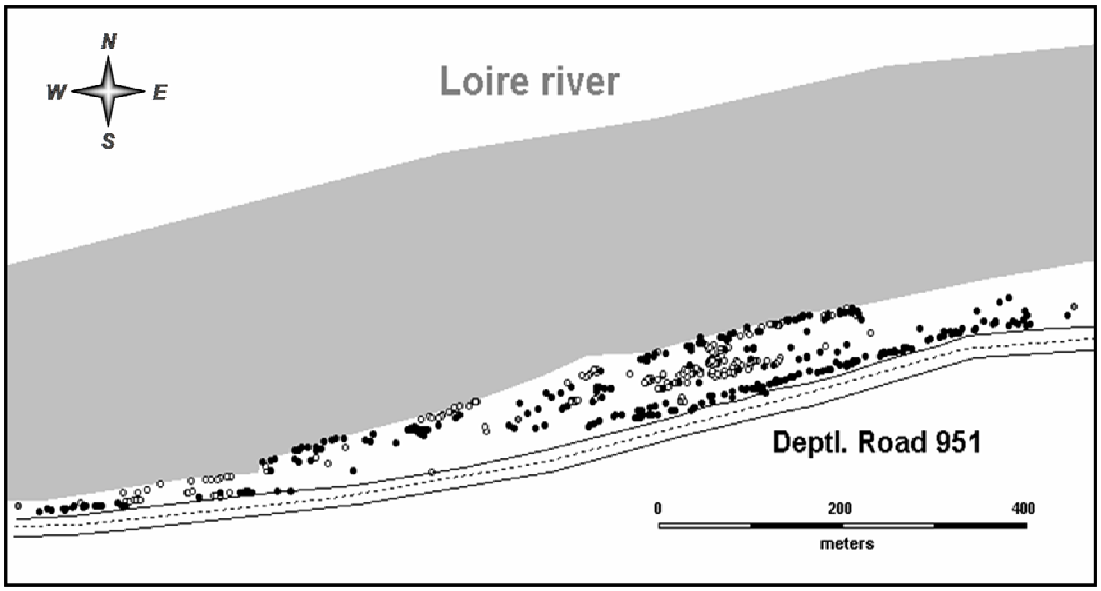


Figure 6. Carte de la population de Saint-Dyé: les points noirs présentent la position des arbres adultes, les points blancs présentent la position des semis.

Tableau 1. Diversité génétique et déviation des proportions d'Hardy-Weinberg pour les 8 loci microsatellites sur l'ensemble des semis.

	A	A_e	H_o	F_{IS}
M2-30	42	8.85	0.849	0.044*
FEMSATL 4	23	5.09	0.794	0.014
FEMSATL 8	26	11.20	0.802	0.120***
FEMSATL 10	30	10.42	0.708	0.218***
FEMSATL 11	29	11.79	0.904	0.014
FEMSATL 12	37	9.93	0.784	0.129***
FEMSATL 16	8	2.10	0.433	0.175***
FEMSATL 19	22	3.84	0.666	0.102***
Mean	27.1	7.90	0.742	0.099***
SD	10.3	3.69	0.145	0.027

A, nombre d'allèles; A_e, nombre d'allèles efficace; H_o, hétérozygotie observée; F_{IS}, coefficient de consanguinité intra-population. Les tests exacts ont été réalisés après 15000 permutations (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). L'écart-type (SD) pour le F_{IS} a été estimé par *jackknifing* sur tous les loci.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la contribution de chaque groupe phénologique au pool génétique des semis. Nous avons testé deux méthodes d'assignation des génotypes des semis à chaque groupe phénologique. Nous avons d'abord utilisé la méthode bayésienne développée par Rannala & Mountain 1997) incorporée dans le logiciel GeneClass v2 (Piry et al. 2004). Les semis ont été assignés au groupe dont ils avaient la probabilité *a posteriori* d'appartenance la plus grande. Etant donnée la faible différenciation des groupes de floraison, nous avons testé la robustesse du critère d'assignation en réassignant chaque individu adulte au sein des groupes de floraison. Puis nous avons simulé des croisements au hasard entre adultes de même groupe phénologique et généré 25000 génotypes de descendants pour estimer le pourcentage d'assignation au groupe des parents. Nous avons également utilisé la fonction discriminante basée sur les distances multivariées décrite au chapitre 3 (1ère partie) pour assigner chaque semis aux groupes de floraison (avec une probabilité *a priori* issue d'une distribution uniforme) en utilisant la procédure DISCRIM de SAS. La première méthode a permis d'obtenir une distribution de semis assigné très significativement différente de celle des adultes ($\chi^2 = 34.88$, d.f. = 4, $P < 0.0001$, Figure 8A,B). La proportion d'individus des groupes 1 et 2 augmente fortement au profit des trois derniers. La deuxième approche a permis quant à elle d'obtenir une distribution différant moins de celle des adultes ($\chi^2 = 9.45$, d.f. = 4, $P < 0.05$, Figure 8A,C), la proportion d'individus dans le groupe 1 seulement augmentant au profit des trois derniers. Cette dernière pourrait être moins sensible à la faible différenciation et donc plus robuste étant donné les pourcentages élevés de bonnes ré-assignations des adultes dans leurs propres groupes (voir chapitre 3, 1ère partie), qui le sont moins avec la première approche (88%, 80%, 66%, 78% et 87% pour les adultes, et 95%, 69%, 63%, 82% et 89% pour les semis simulés dans les groupes 1, 2, 3, 4 et 5 respectivement). Dans tous les cas, les proportions d'individus assignés aux groupes de floraison précoce augmente, mais si l'on privilégie la deuxième méthode, seulement le groupe « *F. angustifolia* » (groupe 1) voit son effectif relatif augmenter.

Enfin, une analyse de parenté a été réalisée sur l'ensemble des semis en utilisant une méthode basée sur le calcul de rapports de vraisemblances (*LOD-scores*, Meagher & Thompson 1986) développée par Gerber et al. 2000) et incorporée dans FaMoz (Gerber et al. 2003). Cette approche a permis d'assigner environ 35% de parentés uniques et très peu (moins de 2%) de parentés doubles. Ce qui estime là encore un taux d'immigration très important, mais cette fois-ci pour les graines (plus de 60%), d'ailleurs similaires à ceux estimés dans une récente étude s'intéressant à la dispersion des graines en populations fragmentées de *F. excelsior* (Bacles et al. 2006). Si l'on attribue les parentés uniques à la mère (la dispersion des

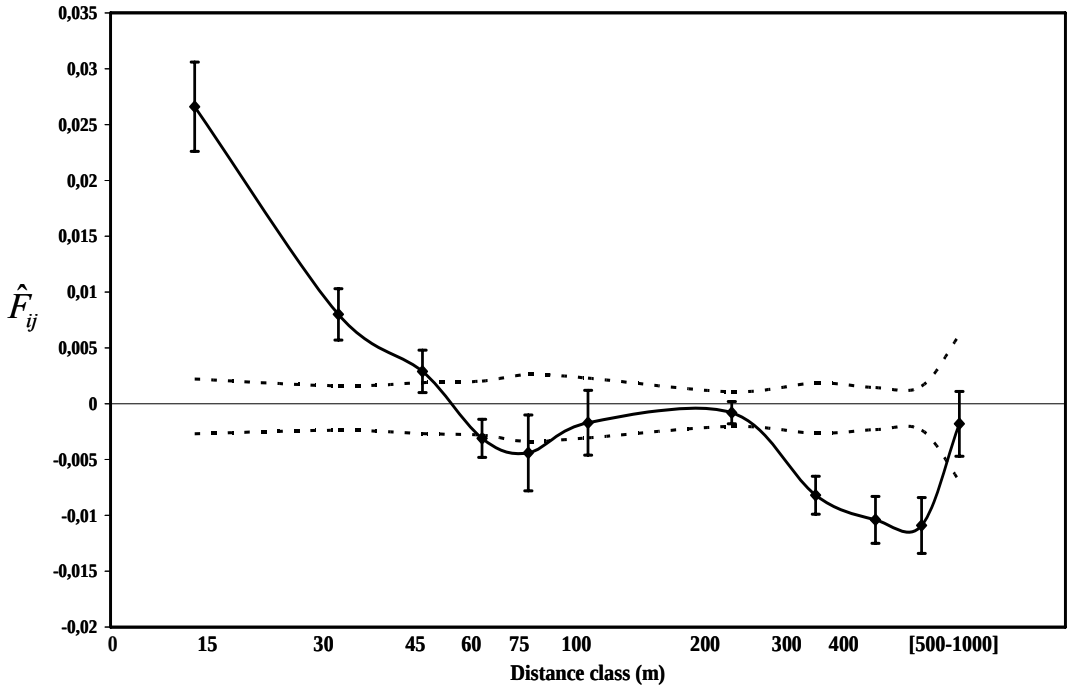


Figure 7. Corrélogramme de l'estimateur du coefficient de parenté (F_{ij}, Loiselle et al. 1995) entre semis en fonction des classes de distance (échelle logarithmique), et écart-types obtenus par *jackknifing* sur l'ensemble des loci. Les pointillés representent les intervalles de confiance à 95% pour l'hypothèse nulle de répartition spatiale au hasard des génotypes (obtenus après 15000 permutations des positions spatiales des individus).

graines est en général très inférieure à la dispersion du pollen et il est certainement peu probable que la graine soit issue d'une mère à l'extérieur pollinisée par un mâle à l'intérieur de la parcelle), cela permet d'estimer un succès reproducteur femelle, par exemple selon le groupe de floraison. Par une régression de Poisson, nous avons estimé l'effet du groupe phénologique sur le succès reproducteur femelle (Procédure GENMOD, fonction de lien = log, SAS) : le succès reproducteur femelle varie significativement selon le groupe phénologique de la mère (LRT type III : χ^2 = 70.29, d.f. = 4, P < 0.0001). Le succès reproducteur est encore une fois supérieur pour le groupe 2 (deux fois supérieur au groupe 3), et le groupe 1 « *F. angustifolia* » (environ trois quarts du groupe 2). Aucun individu du groupe 5 « *F. excelsior* » n'a produit de graine. La distance de dispersion moyenne estimée est de 71 mètres (écart-type 84 mètres), ce qui correspond environ à la moitié de la distance moyenne de dispersion de pollen estimée (voir chapitre 3). Il est à noter également que certains individus ayant produit un nombre relativement important de descendants assignés sont ceux qui ont montré les taux de germination et les tailles d'embryons les plus élevés (voir chapitre 1).

Ces résultats mettent à nouveau en évidence un fort succès de ces hybrides fleurissant tôt, qui semblent posséder, non seulement un succès reproducteur mâle mais aussi un succès reproducteur femelle supérieur aux autres groupes de floraison. De plus, leur représentation semble augmenter dans les générations suivantes. Cependant, les individus à floraison précoce (« *F. angustifolia* ») possèdent un fort succès reproducteur femelle et sont susceptibles également d'augmenter en nombre au cours des générations suivantes. Le fait qu'ils aient produit peu de graines durant les deux années d'étude est relativement étonnant. Outre le fait que les variations annuelles de production de fruits peuvent être éventuellement importantes, les capacités à la germination rapide et la forte croissance durant les premières années pourraient éventuellement conférer un avantage compétitif aux individus de type *F. angustifolia* au sein de cette zone. Leur succès en dehors de cette zone reste par contre complètement inconnu et peut être nettement inférieur ailleurs qu'en ripisylve.

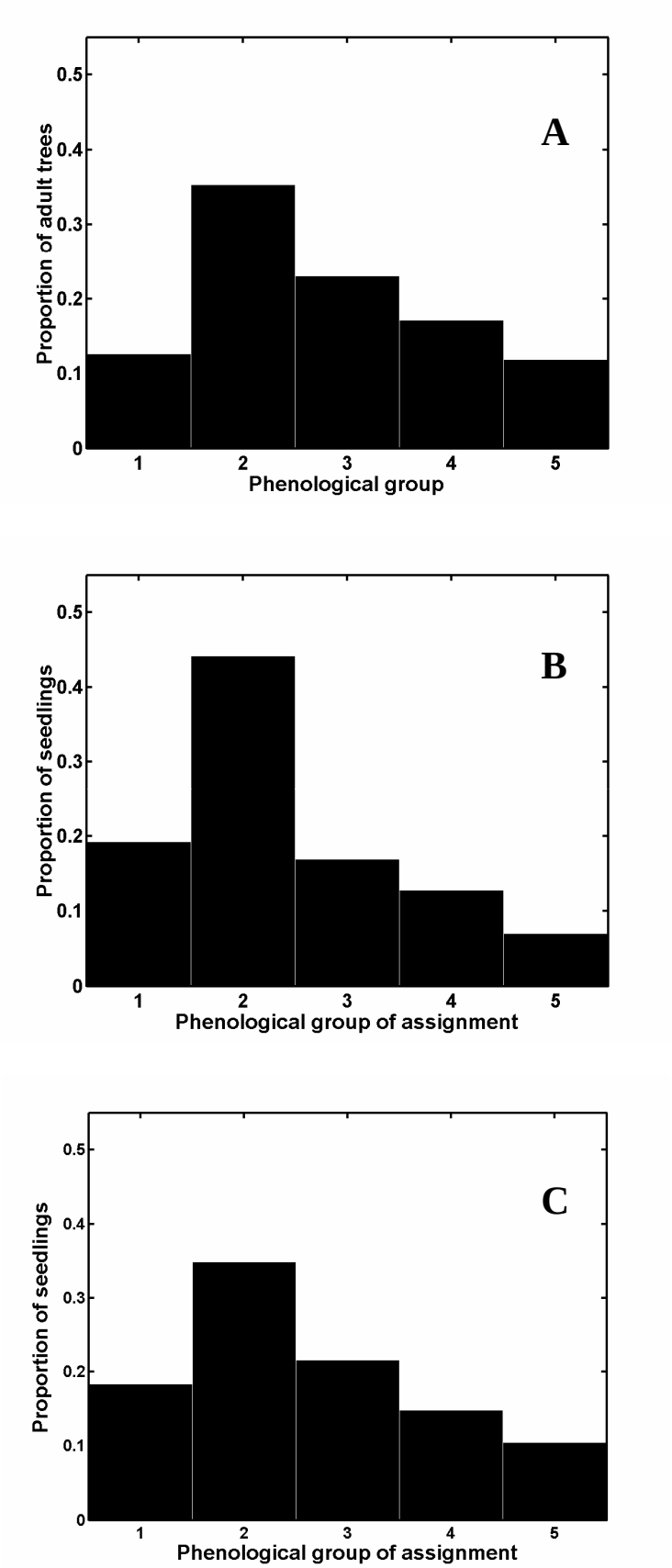


Figure 8. (A) Proportion d'arbres adultes dans les différents groupes phénologiques. (B) Proportion de semis assignés dans les différents groupes par la méthode de (Rannala & Mountain 1997). (C) Proportion de semis assignés dans les différents groupes par la fonction linéaire discriminante.

REFERENCES

Bacles, C. F. E., A. J. Lowe & R. Ennos. 2006. Effective seed dispersal across a fragmented lanscape. Science 311:628.

Gerber, S., P. Chabrier & A. Kremer. 2003. FAMOZ: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. Mol. Ecol. Notes 3:479-481.

Gerber, S., S. Mariette, R. Streiff, C. Bodénès & A. Kremer. 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. Mol. Ecol. 9:1037-1048.

Goudet, J. 1995. FSTAT, a program to estimate F-statistics. J. Hered. 86:485-486.

Hardy, O. J. & X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population level. Mol. Ecol. Notes 2:618.

Loiselle, B. A., V. L. Sork, J. Nason & C. Graham. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). Am. J. Bot. 82:1420-1425.

Meagher, T. R. & E. A. Thompson. 1986. The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. Theor. Pop. Biol. 29:87-106.

Piry, S., A. Alapetite, J.-M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin & A. Estoup. 2004. GeneClass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. J. Hered. 95:536-539.

Rannala, B. & J. L. Mountain. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9197-9201.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux apporte un premier regard sur la structure et l'évolution d'une zone hybride forestière entre deux espèces de frênes autochtones en France, ainsi que sur l'effet de l'isolement temporel dû à une phénologie florale divergente sur les régimes de reproduction en zone hybride. D'autre part, cette thèse ouvre des perspectives intéressantes sur les processus d'hybridation et de spéciation entre *F. excelsior* et *F. angustifolia*.

Nous avons développé des marqueurs permettant la reconnaissance des espèces, mais à l'échelle populationnelle : les marqueurs moléculaires nous permettent de savoir rapidement si un échantillon provient d'une région où seul *F. excelsior* semble présent mais ne sont pas suffisamment discriminants pour repérer les individus hybrides en population naturelle. Les caractères divergents de dormance des graines peuvent être également utilisés pour la certification, et sont quant à eux prometteurs pour l'étude de la variabilité adaptative en zones hybrides. A l'échelle de la France, nous avons pu mettre en évidence l'existence de zones très différentes selon les régions, ce qui semble être lié principalement au climat. Ce dernier apparaît donc comme un facteur déterminant pour limiter l'hybridation. A échelle locale, il est apparu que la phénologie florale était un facteur limitant en partie l'hybridation et façonnant les régimes de reproduction au sein des zones hybrides. Par ailleurs, les différences de phénologie peuvent permettre d'augmenter la réponse à la sélection si celle-ci favorise certaines classes d'individus dans des milieux particuliers, ce qui semble être le cas en ripisylve de la Loire. L'hybridation peut permettre à l'espèce fleurissant très tôt (ici *F. angustifolia*) de produire des individus à floraison intermédiaire moins sensibles aux gels hivernaux, et possédant des caractères de cette espèce leur conférant des capacités colonisatrices fortes. L'augmentation de la fréquence d'individus de *F. angustifolia* au sein des jeunes générations amène à un questionnement sur l'évolution de la zone hybride en cas de changements climatiques. Si l'élévation de température est suffisante pour provoquer une augmentation importante du succès reproducteur de *F. angustifolia*, l'hybridation pourrait permettre à cette espèce de coloniser rapidement la ripisylve, étant donné l'existence de flux de gènes asymétriques.

La principale limite de notre approche réside dans le fait qu'il est difficile de généraliser à d'autres zones hybrides de frênes. En effet, l'étude de deux zones hybrides en France mériterait d'être étendue à une plus grande échelle, avec un échantillonnage régulier entre les aires de répartition des deux espèces. D'autre part, l'étude à échelle locale est certainement insuffisante pour oser des généralisations concernant l'évolution des zones hybrides de frênes, étant donné que l'importance des processus peut être très différents d'une région à l'autre. En

particulier, une étude similaire en Vallée de Saône permettrait d'apporter des éléments de compréhension sur la structure et l'évolution de populations hybrides où les arbres fleurissant tôt ne semblent pas favorisés. La courte période de temps sur laquelle ont été menés ces travaux est une autre limitation : des études à long terme seraient dans ce cas très informatives quant à l'évolution des zones hybrides de frênes.

La recherche de marqueurs totalement discriminants s'est avérée infructueuse, mais elle a permis de comprendre que la problématique de reconnaissance d'espèces devait être appréhendée d'une autre manière, tout en restant à l'écoute des demandes des gestionnaires. Les deux espèces semblent partager une grande partie de leurs génomes et la variation inter-spécifique doit être appréhendée sous un angle adaptatif. De fait, plusieurs caractères potentiellement adaptatifs émergent comme candidats : certains traits morphologiques comme les caractères foliaires ou la verticillation, la phénologie florale, la dormance. Les zones hybrides peuvent être des régions privilégiées pour étudier la variation génétique adaptative chez les arbres forestiers, pour lesquels les plans de croisements multi générationnels sont très lourds à conduire étant données leur longue durée de vie et leur faible souplesse de manipulation. En effet, les zones hybrides sont en général des régions où la variance génétique et phénotypique est très forte, et sont potentiellement intéressantes pour réaliser des cartographies de QTL et identifier des régions génomiques impliquées dans la spéciation (Lexer et al. 2004). La principale limitation à l'heure actuelle pour les frênes est la faible quantité de marqueurs moléculaires disponibles (des AFLP sont en cours de développement) et l'absence d'une carte génétique précise. Une autre solution consiste à tenter de détecter des gènes candidats par homologie, s'il s'agit de gènes très conservés. Par exemple, plusieurs gènes impliqués dans le débourrement floral ont été caractérisés chez *Arabidposis thaliana* : le gène central répresseur du déclenchement de la floraison est le locus *FLOWERING C* (FLC), dont l'expression est contrôlée par plusieurs régulateurs, dont le facteur de transcription *FRIGIDA* (FRI), qui régule positivement sont expression (pour revue voir Boss et al. 2004). La variation allélique à ce locus s'est révélée déterminante pour la variation de date de floraison (Johanson et al. 2000), des traces de sélection ont pu être détectées sur un ensemble de séquences (Le Corre et al. 2002), et la variation à ce locus a pu être étudiée en populations naturelles d' *A. thaliana* afin d'appréhender son potential adaptatif (Le Corre 2005). Ce type de gènes peut être donc potentiellement intéressant pour détecter des régions génomiques impliquées dans l'isolement reproducteur en zone hybride, et nous tentons à l'heure actuelle d'amplifier ce locus chez les frênes.

Un autre candidat intéressant est le gène *PHANTASTICA* (Phan), codant un facteur de transcription impliqué dans la forme des feuilles d'un grand nombre d'espèces, dont *Fraxinus americana* : par exemple sa sous-expression permet de produire des feuilles palmées (type cannabis) au lieu de feuilles pinnées (type frêne) [Kim et al. 2003]. Si l'expression de ce type de gènes peut être impliquée dans le nombre de folioles formées, ceux-ci peuvent être également de bons candidats pour l'étude de la variation adaptative chez les frênes et la recherche de traces de sélection, par exemple au sein de leurs séquences promotrices.

Les gènes impliqués dans la dormance des graines chez *A. thaliana* sont également nombreux à avoir été caractérisés et peuvent être de bons candidats (voir par exemple Koornneef et al. 2002).

L'étude de variations adaptatives en populations naturelles sera certainement plus aisée dans des régions de transition clinale forte entre des populations des deux espèces, par exemple dans des régions où l'élévation d'altitude est rapide. Pour cela, nous avons réalisé un transect en Pyrénées Orientales, où les deux espèces semblent séparées par une étroite zone de transition, *F. excelsior* étant seul à partir de 300m d'altitude et *F. angustifolia* seul en bord de mer.

Les taux élevés d'auto-fécondation détectés au sein des groupes de floraison intermédiaires sont également intrigants. Il a été montré que les auto-fécondations étaient possibles chez *F. excelsior* mais que les graines semblaient avorter avant la fin du développement de l'embryon (Raquin et al., résultats non publiés). Les systèmes d'auto incompatibilité post-zygotiques étant très mal connus (Barrett 1998), il serait intéressant d'utiliser les frênes comme modèle d'étude de ce type de processus : quels types et combien de gènes peuvent être impliqués dans ce type d'auto incompatibilité ? S'il y en a plusieurs, comment évoluent les déséquilibres de liaison en zone hybride ? L'apparition de forts taux d'auto-fécondation entraîne-t-elle une forte augmentation de la dépression de consanguinité ?

Les résultats présentés au chapitre 2 ont révélé quant à eux un besoin d'études phylogéographiques concernant *F. angustifolia* à l'échelle de l'Europe. De tels projets sont en cours d'élaboration, non seulement pour *F. angustifolia*, mais aussi pour d'autres espèces du genre, y compris des espèces Nord-américaines. Des phylogénies de gènes soumis à sélection au sein du complexe *F. angustifolia* / *F. excelsior* pourraient être très utiles à la compréhension de l'histoire et de la divergence des deux espèces (collaboration avec Jean Bousquet, Québec, Canada).

Enfin, les résultats présentés dans cette thèse ont ouvert des pistes pour l'élaboration d'un modèle théorique basé sur des simulations. Par exemple, un modèle démographique simple simulant l'évolution d'une zone hybride suite au contact entre deux espèces partiellement inter-fertiles, l'isolement reproducteur étant causé par un certain degré d'incompatibilités génomiques incluant des relations d'épistasie/dominance (Ferdy & Austerlitz 2002). Le modèle étudie l'influence des paramètres démographiques et génétiques sur le devenir de la zone hybride, dont l'un des états d'équilibre est la domination d'hybrides et de quelques individus des espèces parentales maintenus par migration des populations pure alentours. Il serait par exemple intéressant de développer un modèle plus complexe prenant en compte un habitat hétérogène (par exemple selon des variations climatiques) et une structure en métapopulations. Ceci pourrait permettre d'étudier l'effet d'un éventuel changement d'habitat (changements climatiques) sur le succès démographique d'une des deux espèces selon les valeurs sélectives de chacune et des hybrides dans les différents environnements, le nombre de gènes contrôlant l'isolement reproducteur, le taux d'hybridation, le taux de migration par graine et pollen, le système de reproduction des deux espèces et des hybrides. Ce modèle pourrait être utile à la prédiction de l'éventuel succès démographique de *F. angustifolia* favorisé par des changements climatiques (collaboration avec Frédéric Austerlitz).

Cette thèse apporte donc des éléments de compréhension des zones hybrides forestières, dans lesquelles les hybrides ne sont apparemment pas contre-sélectionnés partout. En cela l'isolement reproducteur temporel ici est particulier, car il n'est pas relié à la diminution de valeur sélective des hybrides, et n'est pas susceptible d'être l'objet de renforcement. Le caractère phénologique étant susceptible d'être relativement plastique, une fois que des évènements d'hybridation ont eu lieu, certains hybrides pourraient posséder une forte valeur sélective dans certaines régions intermédiaires et dominer en nombre les espèces parentales. Si la sélection agit directement sur la phénologie florale par l'intermédiaire des conditions climatiques, on peut donc se questionner sur l'évolution de ces zones en cas de changements climatiques.

REFERENCES

Barrett, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. Trends Pl. Sci. 3:335-341.

Boss, P. K., R. M. Bastow, J. S. Mylne & C. Dean. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. Plant Cell 16:S18-S31.

Ferdy, J.-B. & F. Austerlitz. 2002. Extinction and introgression in a community of partially cross-fertile plant species. Am. Nat. 160:74-86.

Johanson, U., J. West, C. Lister, S. Michaels, R. Amasino & C. Dean. 2000. Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis thaliana* flowering time. Science 290:344-347.

Kim, M., S. McCormick, M. Timmermans & N. Sinha. 2003. The expression domain of PHANTASTICA determines leaflet placement in compound leaves. Nature 424:438-443.

Koornneef, M., L. Bentsink & H. Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. Curr. Op. Plant Biol. 5:33-36.

Le Corre, V. 2005. Variation at two flowering time genes within and among populations of Arabidopsis thaliana: comparison with markers and traits. Mol. Ecol.

Le Corre, V., F. Roux & X. Reboud. 2002. DNA polymorphism at the *FRIGIDA* gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive nonsynonymous variation is consistent with local selection for flowering time. Mol. Biol. Evol. 19:1261-1271.

Lexer, C., B. Heinze, R. Alia & L. H. Rieseberg. 2004. Hybrid zones as a tool for identifying adaptive genetic variation in outbreeding forest trees: lessons from wild annual sunflowers (*Helianthus* spp.). For. Ecol. Manage. 197:49-64.

Les zones hybrides entre taxons proches peuvent offrir un regard privilégié sur les processus évolutifs, en particulier la spéciation. L'évolution de l'isolement reproducteur dans ces zones va dépendre en grande partie de l'intensité des flux de gènes et de la valeur sélective des hybrides. Chez les arbres forestiers, les zones de contact sont souvent très étendues, étant donnés leurs larges distributions, les longues distances de dispersion de pollen et les forts taux d'allofécondation. Nous avons choisi comme modèle d'étude des deux espèces de frênes *Fraxinus excelsio*r L. (frêne commun) et *Fraxinus angustifolia* Vahl (frêne oxyphylle), autochtones en France. Nous avons d'abord développé des marqueurs moléculaires et physiologiques (liés à la dormance des graines) discriminants, qui se sont révélés être de bon outils pour l'aide au diagnostic de reconnaissance, mais insuffisants pour détecter les hybrides en populations naturelles. Nous avons donc utilisé des marqueurs microsatellites et des données morphologiques pour mettre en évidence plusieurs zones hybrides très différentes à l'échelle de la France. Nous avons montré que la distribution des deux espèces et de leurs hybrides était fortement corrélée aux variations de facteurs environnementaux, suggérant que le climat est déterminant pour limiter l'hybridation naturelle. Les deux espèces observant des dates de floraison très divergentes, nous avons étudié l'effet de la phénologie florale sur la limitation des flux de gènes à échelle locale. Nous avons montré l'existence d'un isolement par le temps. Les flux de gènes ont lieu principalement entre individus fleurissant à la même période, et les flux de pollen sont asymétriques. Les hybrides fleurissant tôt sont les plus nombreux, et ont un succès reproducteur mâle et femelle largement supérieur, produisant plus de fleurs et de graines et subissant sensiblement moins d'attaques de gales florales. Observant par ailleurs des taux d'autofécondation élevés, ils pourraient posséder une valeur sélective supérieure dans ce type d'écotone intermédiaire, pouvant accroître leur potentiel colonisateur.

Mots-clés : dormance, microsatellites, phénologie florale, analyses de paternité, isolement reproducteur temporel, hybridation

Hybrid zones between closely related species are useful to study evolutionary processes, particularly speciation. The evolution of reproductive isolation in these zones will mainly depend on the intensity of gene flow and the fitness of hybrids. In forest trees, large scale contact zones usually exist as a result of broad geographical ranges, long-distance pollen flow and high outcrossing rates. We studied natural hybridization between the two ash species *Fraxinus excelsio*r L. (common ash) and *Fraxinus angustifolia* Vahl (narrow-leaved ash), autochthonous in France. First we developed molecular and physiological (based on seed dormancy) markers that discriminate the two species, and which could be applied by forest managers but are insufficient to detect hybrids in natural populations. We used microsatellite markers and morphological data to describe very different hybrid zones at the country scale. We showed that the distribution of the two species and their hybrids are tightly linked with ecological variables, suggesting that climate is an important factor that restricts hybridization. The two species showing very divergent flowering times, we assessed the role of floral phenology in restricting gene flow at a local scale. We detected isolation by time patterns. Reproductive events mainly occur between co-flowering trees, and pollen flow is asymmetric. Early flowering hybrids are widespread, and show a higher male and female reproductive success, producing more flowers and fruits and suffering slightly less floral gale attacks. Otherwise they show relatively high selfing rates, and they may have a higher fitness in this type of intermediate ecotone, possibly increasing their colonizing abilities.

Keywords: dormancy, microsatellites, flowering phenology, paternity analyses, temporal assortative mating, hybridization