

Université Paul Sabatier - Toulouse  
Stage réalisé dans le cadre du module Initiation à la Recherche,  
M1-Mention Écologie

3 – 4 Mai 2012

**UTILITE DES MICROSATELLITES CHLOROPLASTIQUES POUR  
IDENTIFIER DU POLYMORPHISME INTER ET INTRA-SPECIFIQUE  
CHEZ *NORONHIA* SPP. (OLEACEAE)**



*N. emarginata* (STAD. dans DU PETIT THOUARS, 1806)

**Durée du Stage : 23 Janvier – 19 Avril 2012**

Laboratoire Évolution & Diversité Biologique (EDB)  
Bâtiment 4R1 Université Paul Sabatier  
118, route de Narbonne  
31062 Toulouse cedex 9, France

**Maitre de Stage :** Guillaume Besnard

**Contact :** [guillaume.besnard@univ-tlse3.fr](mailto:guillaume.besnard@univ-tlse3.fr)

**Lieu :** UMR 5174, Laboratoire Evolution & Diversité Biologique (EDB), CNRS, ENFA, UPS.

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier Guillaume Besnard, pour l'opportunité qu'il m'a donné de découvrir *Noronhia* spp. Pour l'aide et les conseils qu'il m'a apporté dans ce stage et dans l'élaboration de ce rapport. Pour la patience et le souci du détail qu'il a fait preuve pour le corriger afin de me montrer mes erreurs et d'obtenir le meilleur résultat possible.

Je souhaite ensuite remercier Charlotte, Julie, Pierre et Yves dont les précieux conseils m'ont permis d'avancer plus rapidement dans l'élaboration de mes résultats.



# Sommaire

Résumé – Abstract.....	2
Introduction.....	3
Matériels & méthodes.....	5
Échantillonnage des plantes et extraction d’ADN.....	5
Révélation de polymorphismes microsatellites chloroplastiques.....	6
Analyse des données.....	8
Résultats.....	9
Étude du polymorphisme chloroplastique .....	9
Répartition des espèces le long du gradient altitudinal .....	12
Discussion.....	15
Au niveau interspécifique .....	15
Au niveau intra-spécifique .....	16
Perspectives.....	17
Bibliographie.....	18
Annexe .....	21

## Résumé – Abstract

Le genre *Noronhia* représente à Madagascar une des lignées les plus diversifiées de la famille des Oleaceae. D'origine africaine, le genre a émigré sur Madagascar au début du Miocène, où ce dernier a subi une forte radiation. Actuellement, de nombreuses espèces peuvent être trouvées en parapatry ou en sympatry et cela dans n'importe quel biotope de Madagascar. Les études faites jusqu'ici n'ont pas permis d'établir clairement les liens entre la plupart des espèces (supposée due à des hybridations anciennes). Dans cette étude, nous avons cherché des polymorphismes inter et intra-spécifiques de l'ADN chloroplastique chez *Noronhia* en utilisant des marqueurs microsatellites. Le polymorphisme nous a permis d'affiner *a posteriori* la distinction d'espèces collectées sur trois sites. Entre ces différentes d'espèces, aucun échange récent d'haplotype n'a été observé. Le polymorphisme chloroplastique intra-spécifique est très variable, et dépend probablement de la dynamique et de l'âge des populations de chaque espèce. Il serait intéressant de continuer l'étude avec des marqueurs nucléaires pour étudier plus en détail la dynamique des populations de *Noronhia*, notamment pour mieux comprendre sa diversification.

**Mots clés :** *Noronhia* ; Madagascar ; Microsatellites ; ADN chloroplastique ; Polymorphisme.

In Madagascar, genus *Noronhia* represents one of the most diverse lineages of the Oleaceae family. The genus has migrated from Continental Africa to Madagascar in the early Miocene, where it underwent a huge radiation. Currently, a lot of species can be found in sympatry or parapatry and that in any habitat of Madagascar. The recent studies have failed to establish clear relationships between most of species. In this study, we looked for polymorphisms of plastid DNA in the genus *Noronhia*, using microsatellites in order to identify inter and intraspecific polymorphisms. Polymorphisms allowed us to confirm the distinction of species sampled on three sites. It was noticed that plastid haplotypes were never shared between species. Intraspecific polymorphism was very variable according to the species, and it may depend on dynamic and age of populations of each species. It will be interesting to continue the study with nuclear markers, in order to study the dynamic of *Noronhia* populations, and better understand their diversification.

**Keywords :** *Noronhia* ; Madagascar ; Microsatellites ; Plastid DNA ; Polymorphism.

## Introduction

Madagascar est un des plus importants « hotspots » de biodiversité du monde (YODER & NOVAK, 2006). L'île possède divers biomes qui sont généralement bien délimités depuis une forêt très sèche au Sud-ouest de l'île à la forêt tropicale humide à l'Est (YODER & NOVAK, 2006 ; VENCES *et al.*, 2009). Ces biomes sont généralement caractérisés régionalement et localement par de forts gradients environnementaux, développant une forte diversité et un fort endémisme de la faune et de la flore. Pour exemples, 92% des reptiles, plus de 90% des plantes, ainsi que la totalité des mammifères et amphibiens natifs ne sont présents nulle part ailleurs (VENCES *et al.*, 2009). L'hypothèse dominante du moment énonce que la majorité des lignées endémiques malgaches résulterait d'une dispersion depuis l'Afrique et de l'Inde depuis le début de l'ère Tertiaire. A partir du Miocène, les colonisations depuis l'Afrique seraient majoritaires mais il n'est pas exclu que Madagascar est aussi joué le rôle de source pour des lignées colonisant d'autres continents (VENCES *et al.*, 2009).

Un autre fait intéressant de Madagascar consiste en son micro-endémisme très important. Par exemple chez les amphibiens beaucoup d'espèces ne sont connues que dans une ou deux localités. La mosaïque d'habitats que l'on peut trouver à Madagascar a certainement favorisé cette haute diversification locale, en contribuant à isoler les populations de nombreuses espèces (VENCES *et al.*, 2009). Parmi les angiospermes qui ont subi de fortes radiations à Madagascar, on peut citer certains groupes de Rubiaceae (e.g., *Coffea*, *Gaertnera* ; ANTHONY *et al.*, 2010 ; MALCOMBER, 2002), Poaceae (sous-famille des Bambusoideae ; WATSON & DALLWITZ, 1992), Euphorbiaceae (e.g., *Croton*, *Phyllanthus* ; VENCES *et al.*, 2009), Asteraceae (e.g., genre *Psiadia* ; BESSE *et al.*, 2003), ou encore Oleaceae (avec en particulier le genre *Noronhia* ; PERRIER DE LA BATHIE, 1952).

Le genre *Noronhia* a été décrit pour la première fois par STADMAN dans l'ouvrage de DU PETIT-THOUARS intitulé *Genera Nova Madagascariensia* (1806). Il correspond à l'une des lignées les plus diversifiées de la famille des Oleaceae. Ce genre comprend actuellement 45 espèces décrites, mais la liste ne semble pas exhaustive (HONG-WA & BESNARD, soumis). En effet, C. HONG-WA a récemment suggéré que *Noronhia* devrait comprendre au moins 60-70 espèces à Madagascar (C. HONG-WA, en prep.). On pense que les espèces de ce genre se dispersent via les mammifères, car plusieurs groupes de lémurien (e.g., *Microcebus*, *Lepilemur*, *Eulemur*, *Varecia* ; ANDRIAMAHAROA *et al.*, 2010 ; MARTINEZ, 2010 ; SIMMEN *et al.*, 2006 ; THOREN, 2011) se nourrissent de leurs fruits. Par ailleurs, *Noronhia* est

entomophile et ses fleurs présentent souvent des pétales relativement grands et charnus (PERRIER DE LA BATHIE, 1952). Le temps de génération des espèces de *Noronhia* est mal connu, mais la présence de nombreux jeunes plants, dont certains capables de fructifier avant dix ans, laisse supposer que le turn-over des populations peut être rapide pour certaines espèces (e.g., *N. capuronii* ; G. BESNARD, observations personnelles).

*Noronhia* était jusqu'à récemment considéré comme endémique de Madagascar et des Comores, mais de récentes analyses phylogénétiques (basées sur des données chloroplastiques et nucléaires) ont permis de réviser la taxonomie du genre (HONG-WA & BESNARD, soumis). Désormais, le genre *Noronhia* comprend aussi des espèces du continent africain et des Mascareignes, mais il reste très largement inféodé à Madagascar. Ce genre possède aussi une espèce, *Noronhia emarginata*, qui a été introduite dans diverses îles et régions tropicales (Hawaii, Réunion, Polynésie Française, Atoll de Midway, Floride ; HONG-WA & BESNARD, soumis), généralement pour des raisons ornementales. Cependant, cette espèce est devenue envahissante en région littorale, notamment à Hawaii, mais on ignore encore comment elle est dispersée dans son aire d'introduction.

D'après les topologies phylogénétiques obtenues sur les marqueurs chloroplastiques et nucléaires, le genre *Noronhia* a une origine africaine. Les datations moléculaires ont permis d'estimer que l'ensemble du groupe dériverait d'un ancêtre commun probablement présent en Afrique à l'Oligocène (HONG-WA & BESNARD, soumis). D'après ces mêmes analyses, *Noronhia* a colonisé Madagascar au début du Miocène depuis le Sud de l'Afrique. Suite à un ou plusieurs événements de migration, le genre a subi une très forte radiation à Madagascar. Actuellement, de nombreuses espèces peuvent être trouvées en sympatrie ou en parapatricie (par exemples, plus de cinq espèces ont été observées localement dans les forêts de l'Ankarana ou de Daraina ; C. HONG-WA, G. BESNARD, observations personnelles). La diversification du genre est encore mal comprise, mais la confrontation des données nucléaires et chloroplastiques suggère que de nombreux événements d'hybridation (réticulation) ont eu lieu durant la radiation (HONG-WA & BESNARD, soumis). Par ailleurs, les données moléculaires jusqu'ici utilisées (séquences chloroplastiques de régions inter-géniques, et séquence ITS nucléaires) n'ont pas permis de distinguer certaines espèces proches (e.g., *N. linearifolia* et *N. longipedicellata*, *N. buxifolia* et *N. myrtoïdes*). La variation de l'ADN chloroplastique est d'ailleurs extrêmement faible comme déjà reportée dans d'autres genres de la famille des Oléacées (BESNARD *et al.*, 2011 ; HONG-WA & BESNARD, soumis), et l'utilisation de méthodes alternatives serait nécessaire pour mieux comprendre les

événements de spéciation et la dynamique des populations d'espèces en sympatrie. Il serait notamment nécessaire de développer des outils de génétique des populations, et notamment des marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques.

L'ADN chloroplastique présente quelques spécificités. Il est généralement transmis de façon maternelle et donc seulement dispersé par les graines, ce qui est le cas chez la plupart des Oléacées, et surtout de la sous-famille Oleae (BESNARD *et al.*, 2011). Ce génome est censé ne pas recombiner. Sa nature haploïde permet un séquençage plus simple du génome chloroplastique, mais sa transmission uniparentale fait qu'il est aussi affecté plus fortement par les phénomènes stochastiques (PETIT *et al.*, 1993). L'utilisation de marqueurs chloroplastiques permet une meilleure détection d'événements évolutifs et potentiellement une plus grande efficacité pour détecter les routes de colonisation que les marqueurs nucléaires, et peut être très utile pour tracer l'origine de plantes envahissantes (e.g., PETITPIERRE *et al.*, 2009).

Dans cette étude préliminaire, nous avons recherché des polymorphismes de l'ADN chloroplastique au niveau inter ou intra-spécifique chez le genre *Noronhia*. La transférabilité de 15 loci microsatellites développés chez *Olea europaea* a été testée chez plusieurs espèces de *Noronhia*. L'utilité de ces marqueurs chloroplastiques a été évaluée notamment pour la distinction d'espèces (polymorphisme interspécifique), l'étude des relations phylogénétiques entre espèces, ainsi que pour l'étude de la dynamique de populations de *Noronhia* (polymorphisme intra-spécifique).

## Matériels & méthodes

### Échantillonnage des plantes et extraction d'ADN

Deux cent vingt huit individus ont été échantillonnés sur trois lieux différents à Madagascar : respectivement 115 à Binara et 73 à Marojejy, deux sites situés dans la partie Nord de l'île, et 40 à Andohahela qui est situé dans sa partie sud (Fig. 1). Ces trois sites correspondent à des forêts tropicales humides. Un rameau feuillé (avec des fruits quand cela était possible) a été collecté et mis en herbier pour chaque échantillon. Une feuille était séchée en gel de silice pour l'extraction de l'ADN. Les coordonnées GPS (ainsi que l'altitude) de chaque individu étaient également relevées sur le terrain. D'après la morphologie foliaire des échantillons, plusieurs espèces ont été distinguées. Certains individus n'étaient pas assignés, mais selon ce rapide examen morphologique, nous avons estimé qu'il y avait au moins dix espèces à Binara,

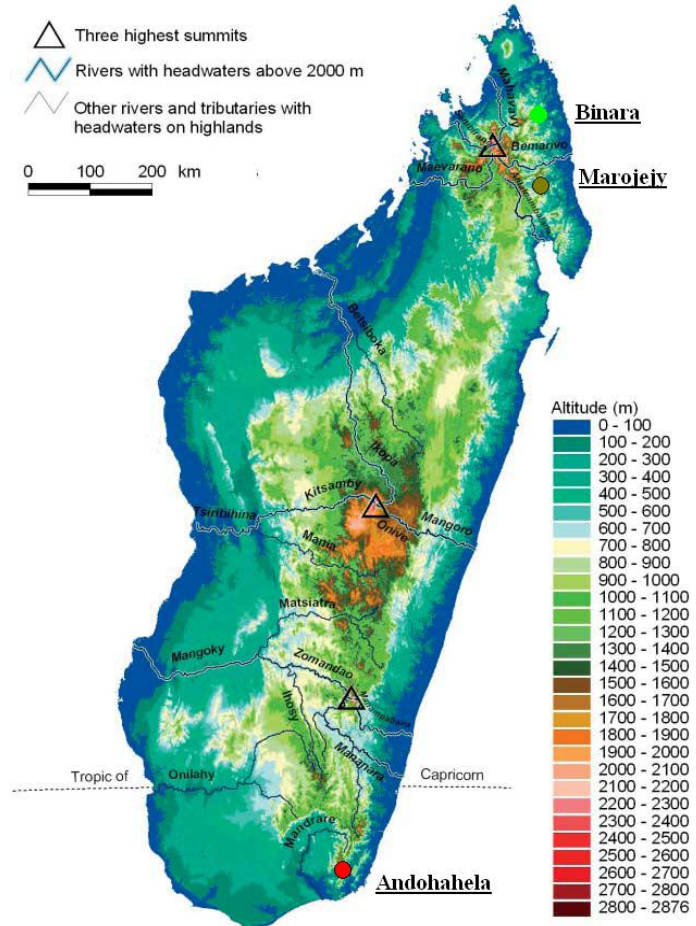


trois espèces à Marojejy et trois espèces à Andohahela. *A posteriori*, cette distinction d'espèces a été confrontée aux données moléculaires, ce qui a permis dans certains cas de l'affiner (voir résultats). Peu d'espèces ont été identifiées dans un premier temps, du fait que nous n'avions généralement pas les caractères des fleurs et des fruits. Toutefois, nous avons pu identifier sans ambiguïté *N. capuronii* (23 échantillons), *N. linearifolia* (1) et *N. grandifolia* (23) à Binara, et *N. verticillata* (32) à Marojejy.

Un total de 223 individus a été caractérisé avec les marqueurs moléculaires (cinq individus de la Forêt de Binara n'ayant pas pu être correctement extraits). Environ 30 mg de feuilles séchées ont été broyées dans un tube Eppendorf de 2 ml en utilisant un Tissuelyzer (QIAGEN) et trois billes de tungstène par tube. Les cellules ont ensuite été lysées, puis l'ADN génomique a été extrait avec le kit Biosprint 15 (QIAGEN), selon le protocole en Annexe 1. La présence d'ADN dans chaque extrait a ensuite été vérifiée en effectuant une migration par électrophorèse sur gel d'agarose 1% de 3 µl de chaque solution d'extraction, suivie d'une visualisation sous UV.

## Révélation de polymorphismes microsatellites chloroplastiques

Chez l'olivier (*Olea europaea*), une Oléacée appartenant à la même tribu que le genre *Noronhia* (WALLANDER & ALBERT, 2000), des amorces ont été conçues pour amplifier par PCR une cinquantaine de fragments d'ADN chloroplastique avec un motif microsatellite ou SSRcp (généralement un poly-T ; BESNARD *et al.*, 2011). Des variants de longueurs ont été révélés sur tous ces loci SSRcp chez *O. europaea*. Quinze de ces loci [loci #5, 11, 12, 21, 22, 24, 27, 29, 33, 36, 41, 43, 44, 50, 51 selon BESNARD *et al.* (2011) ; Annexe 2] ont été testés



**Fig. 1.** Carte topographique de Madagascar représentant les trois lieux échantillonnés : Binara, Marojejy et Andohahela. (WILME *et al.*, 2006).

sur tous nos échantillons. Ces loci ont été choisis sur la base de leur taille chez l'olivier pour pouvoir être *a priori* multiplexés, et parce qu'ils ne présentaient que des variations de longueur de type microsatellite (BESNARD *et al.*, 2011).

Pour révéler les allèles sur un séquenceur à capillaires, les produits PCR doivent être marqués avec un fluorochrome. Trois fluorochromes ont été utilisées dans notre étude : 6-FAM (Bleu), HEX (Vert) et NED (Jaune). Pour chaque fluorochrome, cinq loci microsatellites ont été amplifiés en même temps (FAM : 12, 29, 33, 36, 50 ; HEX : 11, 21, 22, 41, 43 ; NED : 5, 24, 27, 44, 51). Nous avons donc trois « multiplex PCR » (un pour chaque fluorochrome). Dans chaque réaction PCR, seule une amorce M13 ( $5'$ TGTAACGACGGCCAGT $3'$ ) est marquée avec le fluorochrome. Pour chaque locus, une queue de 18 bases correspondant à la séquence M13 a été ajoutée en 5' de l'amorce Forward. Un mix d'amorces doit être en premier lieu préparé pour chaque multiplex PCR. La concentration de chaque amorce dans ce mix est la suivante : 10  $\mu$ M de l'amorce M13 marquée, 2  $\mu$ M de chaque amorce reverse, et 0,5  $\mu$ M de chaque amorce forward (avec queue M13).

La réaction d'amplification PCR (« Polymerase Chain Reaction ») contient dans 20  $\mu$ l, 1  $\mu$ l d'ADN (environ 5-20 ng), 4  $\mu$ l de tampon de réaction (tampon 5x contenant 10 mM MgCl<sub>2</sub>, et fourni avec la *Taq* polymérase), 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM (soit une concentration finale en MgCl<sub>2</sub> de 5 mM), 1  $\mu$ l de dNTPs (soit une concentration finale de 0,2 mM), 11  $\mu$ l d'eau, 1  $\mu$ l du mix d'amorces précédemment préparé et 0,08  $\mu$ l de *Taq* DNA polymérase (GoTaq, Promega). Les plaques sont alors placées sur un thermocycleur T1 (Biometra, Göttingen, Germany) où elles vont subir différentes étapes : 3 minutes à 95°C suivies de 28 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 57°C et 60 secondes à 72°C. Puis 8 cycles de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 51,5°C et 1 minute à 72°C. Le dernier cycle a été suivi par une extension de 20 minutes à 72°C. Par la suite, quelques produits PCR ont été par la suite vérifiés par électrophorèse sur agarose 2,5%.

Le multiplexage des produits PCR est ensuite effectué. Les produits PCR obtenus avec chaque fluorochrome correspondent à cinq loci, et sont dilués dix fois et mélangés ensemble avec du formamide. Un marqueur de taille (Liz500) est également ajouté (0,2  $\mu$ l par échantillon) pour pouvoir l'utiliser comme référence pour estimer la taille des fragments amplifiés. Ces multiplexes sont alors dénaturés à 95°C et envoyés à la Génopole de Toulouse pour être passés sur un séquenceur à capillaire ABI3100 *xl* Genetic Analyzer. Pour chaque

individu, on obtient un chromatogramme avec des pics correspondant aux allèles de chaque locus.

## Analyse des données

La taille des fragments amplifiés a été mesurée avec le logiciel GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems). A partir de là, des haplotypes (la combinaison des allèles des 15 loci) vont être déterminés pour chaque individu amplifié, et pour chaque espèce.

Après avoir effectué la lecture des tailles d'allèles pour chaque locus chez les 223 individus extraits au départ, nous avons décidé d'écarter les données de 13 d'entre eux pour la suite des analyses pour trois raisons : soit pour des incertitudes de lecture, soit parce que l'individu n'a pu être assigné (et il est possible que ce ne soit pas *Noronhia*), et soit parce que nous avons échantillonné qu'un seul représentant d'une espèce (e.g., *N. linearifolia*).

Afin de visualiser les relations phylogénétiques entre haplotypes de *Noronhia* (pour les espèces dont nous avons échantillonnées au moins deux individus) et définir des « haplogroupes », un réseau d'haplotypes a été reconstruit avec la méthode « reduced-median network » implémentée dans le logiciel NETWORK v4.6.1.0 (BANDELT *et al.*, 1999). Cette méthode se base sur un principe de Parcimonie, et elle permet de considérer des loci SSRcp multialléliques. Il faut noter que, dans cette analyse, les allèles sont ordonnés selon leur taille, et par exemple, une différence de deux bases entre allèles d'un locus donné est considérée comme deux événements de mutation.

La diversité génétique totale ( $H_T$ ) et la richesse alléliques ( $R_S$ ) ont été estimées en utilisant le logiciel FSTAT (GOUDET, 2005) pour chaque haplotype (considéré comme allèles provenant d'un locus) et chaque espèce.

En parallèle, l'utilisation du logiciel R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) a permis l'élaboration de graphiques représentant pour les trois sites (Binara, Marojejy et Andohahela) la répartition locale des espèces le long du transect d'échantillonnage et sur le gradient altitudinal.

## Résultats

### Étude du polymorphisme chloroplastique

Les 15 loci développés par BESNARD *et al.* (2011), que nous avons sélectionnés et testés, ont pu être utilisés sur nos échantillons. Seul le locus 50 n'a pu être amplifié chez les 23 individus de *N. grandifolia*, suggérant la présence d'un allèle nul chez cette espèce (cf. haplotype sg01 ; Tableau 1). La caractérisation de tous les échantillons avec ces 15 loci SSRcp a permis de définir un haplotype chloroplastique pour chaque individu. Ceci a également permis de tester si les espèces définies *a priori* sur chaque lieu d'échantillonnage sont valides. Trois constats ont pu être effectués : la plupart des individus semble avoir été préalablement bien classé puisque la plupart des morphotypes *a priori* définis présente des haplotypes propres (et parfois plusieurs pour un morphotype donné) ; quelques individus non ou mal classés présentant des haplotypes communs ont pu être réassignés *a posteriori* à un morphotype commun (par exemple les espèces sympatriques *N. sp8* et *N. sp9* ont été *a posteriori* réassignés à deux taxa distincts alors qu'ils étaient *a priori* traités comme un seul) ; 13 plantes, préalablement non assignées à un groupe, présentent un haplotype unique très différent des autres et n'ont donc pu être *a posteriori* réassignés (9 de Binara, 2 de Marojejy, 2 d'Andohahela). Il est possible que certains de ces individus n'appartiennent pas au genre *Noronhia* (en particulier MSV392, MSV393 et MSV505). Globalement, les marqueurs chloroplastiques ont donc permis de soutenir notre distinction de morphotypes de *Noronhia* mais aussi de l'affiner. On estime désormais qu'il y aurait dans notre échantillonnage 18 espèces d'Oléacées à Binara, six à Marojejy, et six à Andohahela.

Sur les 223 individus analysés, 13 qui n'étaient pas assignés à un groupe ont été exclus pour les analyses suivantes. Au total, les 17 espèces considérées présentent 33 haplotypes différents (Tableaux 1, 2 et 3). A Binara et Marojejy, plusieurs espèces montrent de la variation sur certains loci SSRcp, tandis qu'aucun polymorphisme intra-spécifique n'était détecté à Andohahela. Les espèces présentant le plus de polymorphisme sont *N. capuronii*, *N. sp1* et *N. sp4* avec respectivement neuf, six et six loci polymorphes. *N. sp1* et *N. capuronii* montre chacun cinq haplotype différents (« s101 à s105 » et « sc01 à sc05 »).

Chaque locus présente au moins trois allèles définis par une taille différente (Tableau 4). Les loci 41, 51, 29 et 22 présentent le plus de variation possédant respectivement 11, 10, 9 et 7 allèles différents. On observe en moyenne 5,4 allèles par locus. On retrouve du

polymorphisme pour le locus 41 chez six espèces (*N. sp1*, *N. sp2*, *N. sp4*, *N. capuronii*, *N. sp8* et *N. sp10* ; Tableau 4). A l'inverse les loci 33 et 36 ne présentent aucune variation intra-spécifique. Au niveau intra-spécifique, certains loci polymorphes présentent jusqu'à quatre allèles (locus 41 chez *N. sp1* et locus 21 chez *N. capuronii* ; Tableau 4).

Locus	Haplotype																				
	s101	s102	s103	s104	s105	sg01	s201	s202	s203	s301	s401	s402	s403	sc01	sc02	sc03	sc04	sc05	s501	s601	s701
51	138	139	140	138	138	135	134	134	134	134	136	136	135	136	136	138	136	136	135	134	137
41	175	178	179	177	177	174	170	171	172	168	174	174	173	171	171	172	171	174	176	177	175
29	198	198	198	198	198	206	201	201	201	198	201	201	200	201	201	202	201	202	204	198	199
21	98	98	98	98	98	97	98	98	98	97	98	98	98	100	99	101	102	100	98	97	97
11	127	127	127	127	127	126	127	127	127	127	127	127	127	128	128	128	128	129	126	127	127
36	178	178	178	178	178	179	178	178	178	178	176	176	176	178	178	178	178	178	178	179	178
50	220	220	220	220	220	220	220	220	220	220	219	219	220	219	219	219	219	220	220	220	220
5	93	93	93	93	93	93	94	94	94	94	93	93	93	93	93	93	95	93	93	92	92
44	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188	188
27	107	106	106	107	107	107	107	107	107	107	105	106	106	106	106	106	107	106	105	106	107
22	156	156	156	156	156	155	154	154	154	155	156	157	156	157	157	156	157	158	157	154	154
43	206	206	206	206	206	205	206	206	206	206	207	207	207	207	207	206	207	206	206	206	209
12	128	128	128	129	128	126	129	129	129	129	127	128	128	128	127	127	127	127	126	128	128
24	180	180	180	181	181	179	180	180	180	181	180	180	181	180	180	180	180	180	180	181	181
33	232	232	232	232	232	231	230	230	230	231	231	231	231	231	230	230	230	233	232	231	231
Occurrence	6	4	10	2	1	23	9	2	5	4	2	1	1	18	1	1	1	2	3	2	4

**Tableau 1.** Haplotypes chloroplastiques définis sur la base des allèles détectés à 15 loci SSRcp pour les accessions de Binara

**Tableau 2.** Haplotypes chloroplastiques définis sur la base des allèles détectés à 15 loci SSRcp pour les accessions de Marojejy

Locus	Haplotype							
	s801	s802	s803	s901	s1001s1002s1003	sv01		
51	138	138	138	138	140	140	140	134
41	177	178	176	176	171	171	172	173
29	203	203	203	199	199	199	199	204
21	97	97	97	98	98	98	98	98
11	127	127	127	127	126	126	126	126
36	178	178	178	178	179	179	179	179
50	220	220	220	220	219	219	219	220
5	93	93	93	92	92	92	92	93
44	188	188	188	188	185	185	185	189
27	106	106	107	106	105	105	105	105
22	156	156	156	154	153	153	153	160
43	206	206	206	208	206	206	206	206
12	128	128	128	127	128	128	128	126
24	181	181	181	181	179	179	179	180
33	230	230	230	231	231	231	231	231
Occurrence	6	1	1	5	24	1	1	32

**Tableau 3.** Haplotypes chloroplastiques définis sur la base des allèles détectés à 15 loci SSRcp pour les accessions d'Andohahela

Locus	Haplotype			
	s1101s1201s1301s1401			
51	131 133 138 138			
41	171 174 170 176			
29	199 199 202 197			
21	98 98 97 98			
11	128 128 127 126			
36	179 179 179 179			
50	220 220 220 220			
5	92 92 93 92			
44	188 188 188 188			
27	108 106 106 106			
22	154 153 153 156			
43	206 206 206 205			
12	129 128 129 127			
24	181 180 181 182			
33	231 231 232 231			
Occurrence	8 9 2 18			

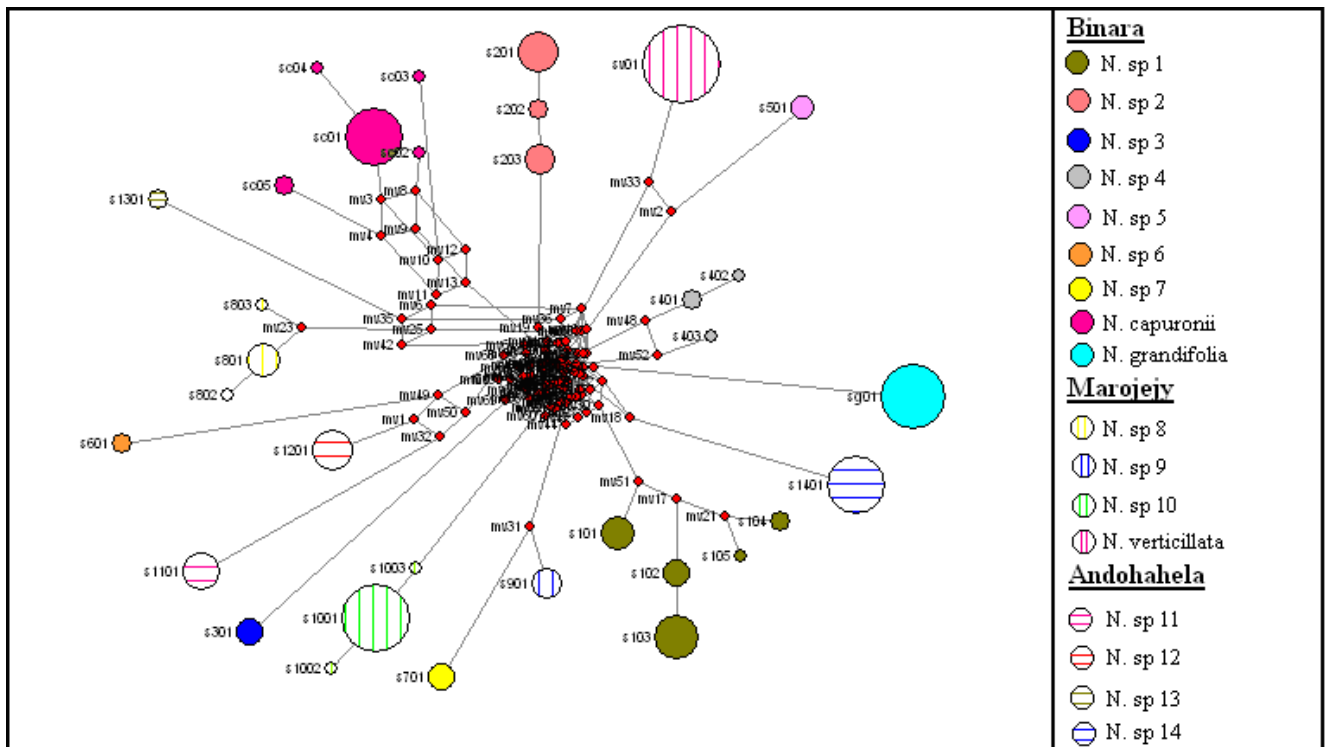
Espèce Locus	BINARA									MAROJEJY				ANDOHAEHA				Nb. Allèles
	<i>N. sp 1</i>	<i>N. grandifolia</i>	<i>N. sp 2</i>	<i>N. sp 3</i>	<i>N. sp 4</i>	<i>N. capuronii</i>	<i>N. sp 5</i>	<i>N. sp 6</i>	<i>N. sp 7</i>	<i>N. sp 8</i>	<i>N. sp 9</i>	<i>N. sp 10</i>	<i>N. verticillata</i>	<i>N. sp 11</i>	<i>N. sp 12</i>	<i>N. sp 13</i>	<i>N. sp 14</i>	
51	3	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	10
41	4	-	3	-	2	3	-	-	-	3	-	2	-	-	-	-	-	11
29	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
21	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
11	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
50	-	X	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
5	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
44	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
27	2	-	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	4
22	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
43	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
12	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
24	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
$R_S$	4,387	1	2,949	NA	NA	3,571	NA	NA	NA	3	NA	2,05	1	1	1	NA	1	
$H_T$	0,735	0	0,608	0	0,714	0,391	0	0	0	0,464	0	0,151	0	0	0	0	0	
Nb. Ind./taxon	23	23	16	4	4	23	3	2	4	8	5	26	32	8	9	2	18	

**Tableau 4** Polymorphisme alléliques par locus SSRcp et par espèce. Le nombre d'allèles différents est reporté pour chaque locus (lorsqu'il est supérieur ou égal à 2). Le  $H_T$  représente la diversité en haplotype pour une espèce donnée.  $R_S$  représente la richesse en haplotype pour une espèce donnée (il a été calculé pour les espèces d'au moins huit individus). X désigne la présence d'un allèle nul (non amplifié).

Les valeurs maximums du  $H_T$  (Tableau 4) correspondent à 0,735 (*N. sp1*), 0,714 (*N. sp4*) et 0,608 (*N. sp2*). Pour le  $R_S$ , les valeurs les plus élevées sont de 4,387 (*N. sp1*), 3,571 (*N. capuronii*) et 2,949 (*N. sp2*) haplotypes pour un échantillon de huit individus. Entre les sites, il semble qu'il y ait une diversité et une richesse en haplotypes plus élevées à Binara, que dans les sites de Marojejy et Andohahela. Il n'y a d'ailleurs aucune variation intra-spécifique dans ce dernier. A Binara, pour les quatre espèces les mieux échantillonnées en bas et au milieu du gradient (*N. sp1*, *N. sp2*, *N. grandifolia* et *N. capuronii*), nous avons observé un relativement haut niveau de polymorphisme sur trois espèces, tandis que la quatrième est monomorphe (*N. grandifolia*). Par contre, les espèces se trouvant dans le haut du gradient altitudinal (*N. sp3*, *N. sp5*, *N. sp6*, *N. sp7*) sont également monomorphes, mais elles restent mal échantillonnées (maximum 4 individus collectés ; Tableau 4).

Le réseau d'haplotypes (Fig. 2) construit avec l'analyse « reduced-median network » montre que les haplotypes d'une espèce donnée sont interconnectés et forment un groupe séparé (« haplogroupe ») : sc01/sc02/sc03/sc04/sc05, s101/s102/s103/s104/s105, s201/s202s/203, s401/s402/s403, s801/s802s/s803 et s1001/s1002/s1003. On note aussi

quelques possibles apparentements entre haplotypes chloroplastiques de différentes espèces. En particulier, les haplotypes sv01 et s501 présentent un raccord relativement proche. Il en est de même pour d'autres haplotypes : [s601-S1101-s1201], [s701-s901], et [(sc01/sc02/sc03/sc04/sc05)-(s801/s802s/s803)-s1301]. L'enchevêtrement central montre que les relations phylogénétiques entre la plupart des haplotypes chloroplastiques des différentes espèces de *Noronhia* ne sont absolument pas résolues.

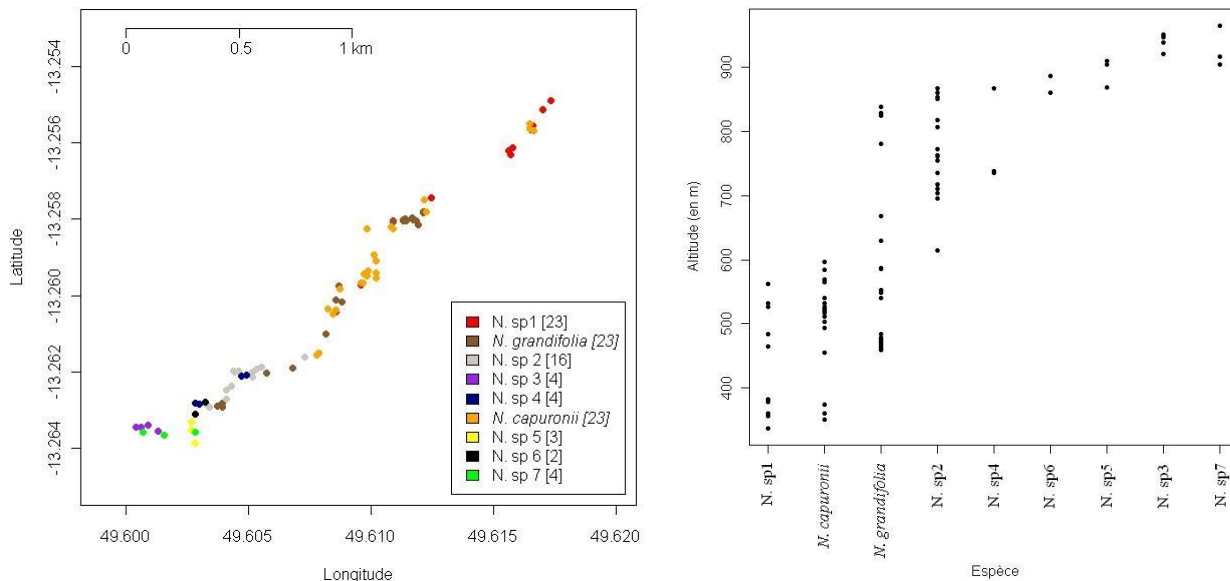


**Fig. 2** Réseau des haplotypes chloroplastiques des Oleaceae collectés sur les trois sites d'échantillonnage. Les espèces et localités sont distinguées respectivement par une couleur et un motif différents (Binara : plein, Marojejy : hachure verticale, Andohahela : hachure horizontale). L'analyse « reduced-median network » a été effectuée avec le logiciel Network v4.6.1.0 (BANDELDT *et al.*, 1999). Chaque haplotype est codée par un cercle.

## Répartition des espèces le long du gradient altitudinal

Sur le site de Binara (Fig. 3), les individus de *Noronhia* ont été échantillonnés depuis la limite savane-forêt à une altitude de 337 jusqu'au sommet vers 965 mètres. *N. sp1* et *N. capuronii* ont été collectés en sympatrie (337–567 m) sur la partie basse du transect. Deux autres espèces (*N. grandifolia* et *N. sp2*), dont les répartitions locales se chevauchent également, se succèdent sur le transect jusqu'à environ 850 m d'altitude. Ces quatre premières espèces sont relativement abondantes et ont été bien collectées (entre 16 et 23 individus). Par contre, cinq autres espèces (*N. sp3*, *N. sp4*, *N. sp5*, *N. sp6* et *N. sp7*) ont été collectées sur la partie haute du transect, avec aussi des répartitions chevauchantes, mais ces espèces sont beaucoup moins

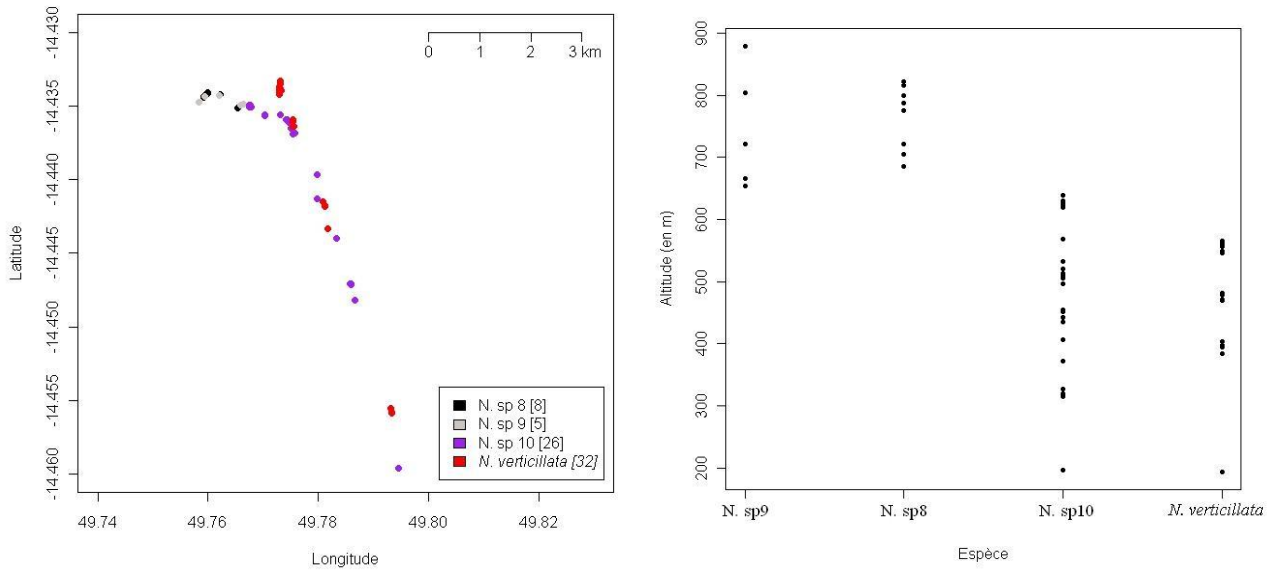
abondantes. A noter que *N. grandifolia* présente la plus importante amplitude altitudinale, qui s'étale sur 378 m (460–838 m).



**Fig. 3** Représentation de la distribution géographique (figure de gauche) et du gradient altitudinal de la zone de Binara

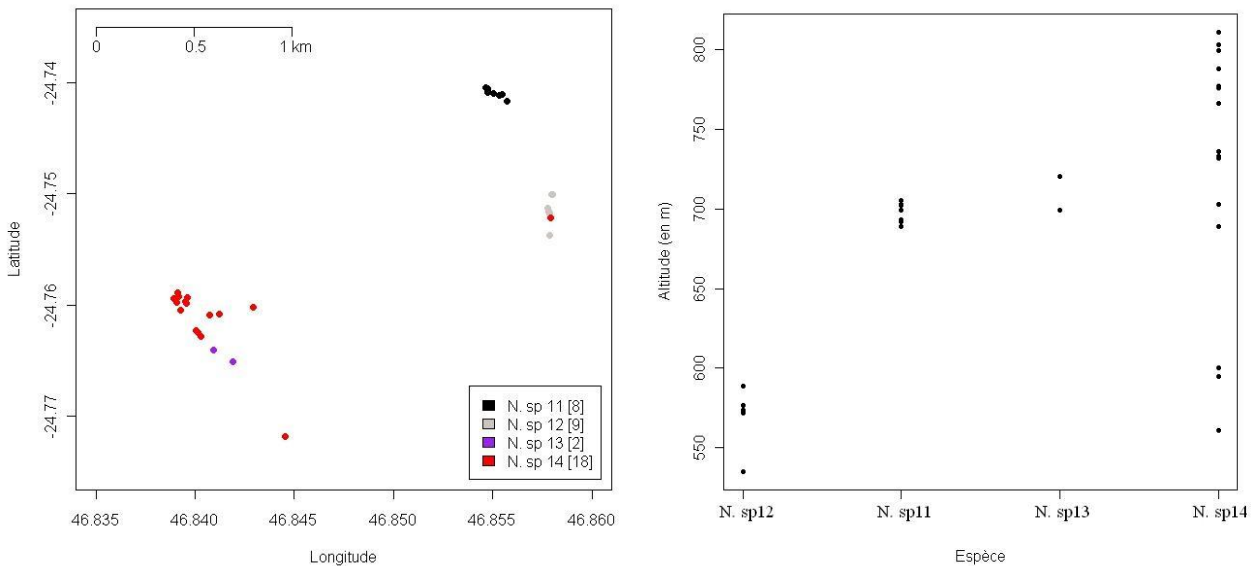
Sur le site de Marojejy (Fig. 4), la distribution des individus collectés varie d'une altitude de 193 à 880 m. *N. verticillata* (193–566 m) et *N. sp10* (197–639 m) sont sur la partie basse du transect. Bien qu'apparemment en sympatrie (Fig. 4), on sait que ces deux espèces ont colonisé des milieux très différents : *N. verticillata* est en bord de ruisseau (milieu ouvert) tandis que *N. sp10* a été collecté systématiquement en sous bois à plusieurs mètres du ruisseau. Par contre, *N. sp8* et *N. sp9* sont en sympatrie sur la partie haute du transect (654–880 m), et leurs exigences écologiques seraient assez similaires (sous bois sur une pente très accentuée).





**Fig. 4** Représentation de la distribution géographique (figure de gauche) et du gradient altitudinal de la zone de Marojejy

Sur le site d'Andohahela (Fig. 5), la distribution des échantillons collectés s'effectue d'une altitude de 535 à 811 m. *N. sp14* est présente sur une relativement large échelle altitudinale (561–811 m), et elle a été collectée à des points relativement distants (et à proximité de deux autres espèces de *Noronhia* : *N. sp12* et *N. sp13*). Par contre, les trois autres espèces (*N. sp11*, *N. sp12* et *N. sp13*) ont été collectées localement sur une courte distance (200 à 300 m) le long de deux transects de collecte.



**Fig. 5** Représentation de la distribution géographique (figure de gauche) et du gradient altitudinal de la zone d'Andohahela

## Discussion

Afin de détecter du polymorphisme chloroplastique dans le genre *Noronhia* (à la fois au niveau intra- et interspécifique), nous avons testé 15 loci microsatellites chloroplastiques qui se sont avérés être tous polymorphes et un minimum de trois allèles a été révélé par locus. Seul un locus n'a pas fonctionné sur tous les individus d'une espèce. Ce résultat démontre une excellente transférabilité des loci SSRcp entre deux genres d'Oleaceae (*Olea* et *Noronhia*) et nous devrions donc être capables d'utiliser la plupart de ces marqueurs sur tous les autres genres de cette tribu. Par ailleurs, tous les loci SSRcp (51) développés par BESNARD *et al.* (2011) n'ont pas été testés, et il est évident que les loci restants permettront de détecter d'autres polymorphismes intra- et interspécifiques chez *Noronhia*.

Le polymorphisme interspécifique nous a permis de déterminer si la distinction d'espèces sur le terrain était correcte ou non. Il s'avère que la plupart des échantillons (env. 90%) étaient correctement assignés à un groupe. Ces marqueurs nous ont aussi permis d'affiner notre assignation puisque des individus non assignés ont été regroupés et certains groupes ont été scindés en deux *a posteriori*. On estime désormais qu'il y aurait une trentaine d'espèces d'Oléacées dans les 226 échantillons collectés sur trois sites distants. La forêt de Binara en recelant à elle seule 18 espèces (Marojejy et Andohahela en possèdent chacun six).

### Au niveau interspécifique

Chaque groupe (espèce), que nous avons défini avant tout sur la base de la morphologie foliaire, présente des haplotypes chloroplastiques propres. Ces résultats indiquent qu'il n'y aurait pas d'échanges d'haplotypes chloroplastiques entre espèces (et donc pas d'hybridation). Cependant, le génome chloroplastique est transmis maternellement et il ne peut donc pas permettre de révéler des événements d'hybridation. L'utilisation de marqueurs nucléaires serait nécessaire pour confirmer ou non l'absence de mélanges récents.

L'analyse « reduced-median network » a montré qu'on ne pouvait pas trouver de lien phylogénétique évident entre les différentes espèces d'un même site sur la base de nos marqueurs SSRcp. De plus, la majorité des relations entre haplotypes sont totalement irrésolues (cf. centre du réseau ; Fig. 2). Les marqueurs chloroplastiques ne seront donc *a priori* pas très utiles pour étudier les relations phylogénétiques entre les espèces. En effet, le fort taux de mutation sur les marqueurs de type microsatellite aboutit à un très haut niveau

d'homoplasie au niveau générique. Ce type de marqueur serait par contre potentiellement utile pour étudier les relations entre des espèces proches.

À Binara et Marojejy, les espèces se succèdent sur le gradient altitudinal. Néanmoins On observe des zones de chevauchement entre les espèces et certaines sont même en apparente sympatrie (*N. sp1* – *N. capuronii* ; *N. grandifolia* – *N. sp2* ; *N. sp8* – *N. sp9*) avec des individus de différentes espèces collectés à moins de cinq mètres l'un de l'autre. Par contre, pour *N. verticillata* et *N. sp10*, les deux taxa semblent répartis similairement sur le gradient altitudinal mais il s'agit d'un cas de parapatrie car les deux espèces sont clairement présentes dans des milieux très différents (i.e., bord de rivière *vs.* sous-bois). On remarque ainsi un véritable gradient de diversification en fonction de l'élévation, ce processus habituellement est supposé apparaitre avec des populations parapatriques (VENCES *et al.*, 2009). Deux théories principales s'affrontent pour expliquer cette distribution des espèces. D'abord la théorie des niches, la répartition de chaque espèce est influencée par les conditions écologiques de leur milieu, c'est le déterminisme environnemental (HUTCHINSON, 1957). Ensuite, la théorie neutre de HUBBELL (2001), qui s'applique majoritairement en milieu tropical, énonce que toutes les espèces sont équivalentes et que leurs distributions s'effectuent d'abord aléatoirement puis elles ont tendance à s'agréger du fait d'une dispersion limitée. Ces deux théories pourraient expliquer le fait que certaines espèces ne sont représentées qu'en basse altitude (e.g., *N. sp1*, *N. capuronii*) et d'autres qu'en haute altitude (e.g., *N. sp3*, *N. sp7*). Néanmoins il faut savoir que l'effet combiné du déterminisme environnemental et de la dispersion limitée pourrait avoir un effet sur le patron de distribution des espèces (REJOU-MECHAIN *et al.*, 2011).

## Au niveau intra-spécifique

Le maintien de variations alléliques pour un locus donné chez une espèce est dû principalement à trois facteurs :

- Tout d'abord, l'accumulation des mutations est une fonction du temps. L'âge d'une lignée joue donc un rôle important, car plus elle sera ancienne plus elle aura eu le temps d'accumuler des variations, augmentant ainsi sa diversité.

- Ensuite, la fluctuation de la taille de la population est un autre facteur important qui va mener à l'érosion de la diversité apparue par mutation (dérive génétique). L'ADN chloroplastique est très sensible à la dérive génétique car transmis seulement par un parent. D'après KIMURA (1983), la plupart des polymorphismes observés au niveau moléculaire sont

sélectivement neutres et leur dynamique d'évolution est déterminé essentiellement par la dérive génétique, c'est la « théorie neutraliste de l'évolution moléculaire ». La dérive génétique est d'autant plus forte lorsque l'on se trouve dans une population de petite taille.

- Enfin, un troisième facteur est la possibilité de migrations entre populations, et même entre espèces (hybridations). Ceci permettra d'augmenter la diversité du fait d'échange d'allèles entre populations/espèces.

Les marqueurs chloroplastiques ont permis de détecter du polymorphisme au niveau intra-spécifique chez certaines espèces de *Noronhia*, mais pas toutes. Aucun polymorphisme intra-spécifique n'a été observé à Andohahela suggérant que les espèces étudiées ont subi une expansion récente. Par contre, à Binara, les deux espèces collectées sur le bas du gradient de diversité altitudinal (*N. sp1* et *N. capuronii*) présentent les plus hautes valeurs de diversité de notre étude. Deux autres espèces (*N. sp2* et *N. sp4*) au milieu du gradient altitudinal présentent également de la diversité SSRcp. Cela suggère que la taille des populations de ces espèces à Binara est restée plus stable que pour d'autres espèces, ce qui a permis un maintien important de diversité. Le taux de mutation moyen de ces marqueurs chez *Olea europaea* est  $\mu = 1,14 \cdot 10^{-5}$  (en nombre de mutation par génération) suggérant que la diversité SSRcp observée chez ces espèces est certainement relativement ancienne (probablement bien avant la dernière glaciation).

## Perspectives

Beaucoup d'incertitudes restent en suspens sur l'assignation des groupes, et il est encore nécessaire d'identifier la plupart des espèces étudiées. Nous proposons de séquencer l'ITS plus un segment chloroplastique (*trnS-trnG*) pour lesquels des bases de données sont déjà disponibles (HONG-WA & BESNARD, soumis), afin d'aider l'identification (barcoding). Un individu pour chaque haplotype chloroplastique sera analysé. Ces marqueurs permettront à la fois de vérifier si chaque espèce correspond bien à *Noronhia*, mais aussi de les replacer dans un arbre phylogénétique de la tribu Oleae (HONG-WA & BESNARD, soumis).

Pour améliorer cette étude préliminaire, il est nécessaire de compléter l'échantillonnage sur plusieurs transects pour chaque site d'étude (en particulier Binara). Au niveau des marqueurs chloroplastiques, seulement 15 ont été testés, et il serait judicieux de tester l'ensemble des marqueurs disponibles. Ceci devrait permettre de détecter de nouveaux polymorphismes. Le développement de microsatellites nucléaires permettra aussi de mieux étudier la diversification et la structuration des populations de *Noronhia*. On pourra étudier la

dynamique des espèces (flux de gènes entre massifs proches, courbe de dispersion des gènes...), et détecter facilement d'éventuels événements récents d'admixture (hybrides). Pour les analyses on pourrait aussi mesurer l'apparentement entre les individus et le comparer à la distance géographique les séparant afin de mieux estimer l'effet de l'isolement par la distance (e.g., MALECOT, 1946).

On peut conclure en rappelant qu'actuellement on dénombre 45 espèces de *Noronhia*. Mais la diversité en espèces observées sur un si petit échantillonnage et sur seulement trois sites différents mène à penser que le nombre d'espèces de *Noronhia* est largement sous évalué (HONG-WA & BESNARD, soumis), notamment dans le nord de Madagascar où il y a une mosaïque d'habitats contenant de nombreuses espèces endémiques à aire de distribution très restreinte (VENCES *et al.*, 2009).

## Bibliographie

- ANDRIAMAHAROA H., BIRKINSHAW C.R., LUDOVIC R., 2010. Day-time feeding ecology of *Eulemur cinereiceps* in the Agalazaha forest, Mahabo-Mananivo, Madagascar. *Madag. Conserv. Dev.* **5**: 55–63.
- ANTHONY F., DINIZ L.E.C., COMBES M.C., LASHERMES P., 2010. Adaptive radiation in *Coffea* subgenus *Coffea* L. (Rubiaceae) in Africa and Madagascar. *Plant Syst. Evol.* **285**: 51–64.
- BANDELT H.J., FORSTER P., RÖHL A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 37–48.
- BESNARD G., HERNANDEZ P., KHADARI B., DORADO G., SAVOLAINEN V., 2011. Genomic profiling of plastid DNA variation in the Mediterranean olive tree. *BMC Plant Biol.* **11**: 80.
- BESNARD G., RUBIO DE CASAS R., VARGAS P., 2007. Plastid nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *J. Biogeogr.* **34**: 736–752.
- BESSE P., DA SILVA D., HUMEAU L., GOVINDEN-SOULANGE J., GURIB-FAKIM A., KODJA H., 2003. A genetic diversity study of endangered *Psiadia* species endemic from Mauritius Island using PCR markers. *Biochem. Syst. Ecol.* **31**: 1427–1445.

- DU PETIT-THOUARS A., 1806. *Genera nova Madagascariensia secundum methodum lussiaenam disposita*. Bibliothèque de l'état de Bavière, 29 pages.
- GOUDET J., 2005. FSTAT: a program to estimate and test population genetics parameters. <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- HONG-WA C., BESNARD G., Mosaic patterns of relationships in the olive family as inferred from multi-locus plastid and nuclear DNA sequence analyses: a close up on *Chionanthus* and *Noronhia* (Oleaceae). Soumis à *Mol. Phylogenet. Evol.*
- HUBBELL S.P., 2001. *The unified neutral theory of biodiversity and biogeography*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- HUTCHINSON G.E., 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **22**: 415–427.
- KIMURA M., 1983. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- MALCOMBER S.T., 2002. Phylogeny of *Gaertnera* Lam. (Rubiaceae) based on multiple DNA markers: Evidence of a rapid radiation in a widespread, morphologically diverse genus. *Evolution* **56**: 42–57.
- MALÉCOT G., 1946. La consanguinité dans une population limitée. *C. R. Acad. Sci. Paris* **222**: 841–843.
- MARTINEZ B.T., 2010. Forest restoration in Masaola National Park, Madagascar: the contribution of red-ruffer lemur (*Varecia rubra*) and the livelihoods of subsistence farmers at Ambatoladama. PhD Dissertation, The University of Minnesota, St Paul.
- PERRIER DE LA BÂTHIE H., 1952. — Révision des Ebenaceae de Madagascar et des Comores. *Mém. Inst. Sci. Madagascar, Sér. B, Biol. Vég.* **4**: 93–154.
- PETIT R.J., KREMER A., WAGNER D.B., 1993. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity* **71**: 630–641.
- PETITPIERRE B., PAIRON M., BROENNIMANN O., JACQUEMART A.L., GUISAN A., BESNARD G., 2009. Plastid DNA variation in *Prunus serotina* var. *serotina* (Rosaceae), a North American tree invading Europe. *Eur. J. For. Res.* **128**: 431–436.

- R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org/>
- REJOU-MECHAIN M., HARDY O.J., 2011. Properties of similarity indices under niche-based and dispersal-based processes in communities. *Am. Nat.* **177**: 589–604.
- SIMMEN B., SAUTHER M.L, SOMA T., RASAMIMANANA H., SUSSMAN R.W, JOLLY A., TARNAUD L., HLADIK A., 2006. Plant species fed on by *Lemur catta* in gallery forest of the southern domain of Madagascar. In: JOLLY A., SUSSMAN R.W., KOYAMA N., RASAMIMANANA H., *Ringtailed lemur biology: Lemur catta in Madagascar*, Springer, New York, pp.55–68.
- THORÉN S.I.K, 2011. *Comparative feeding ecology of two sympatric mouse lemurs (Microcebus spp.) in northwestern Madagascar*. PhD Dissertation, The University of Veterinary Medicine, Hannover.
- VENCES M., WOLLENBERG K.C., VIEITES D.R., LEES D.C., 2009. Madagascar as a model region of species diversification. *Trends Ecol. Evol.* **24**: 456–465.
- WALLANDER E., ALBERT V.A., 2000. Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *Am. J. Bot.* **87**: 1827–1841.
- WATSON L., DALLWITZ M.J., 1992. Grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>
- WILMÉ L., GOODMAN S.M., GANDZHORN J.U., 2006. Biogeographic evolution of Madagascar's microendemic biota. *Science* **312**: 1063–1065.
- YODER A., NOWAK M.D., 2006. Has vicariance or dispersal been the predominant biogeographic force in Madagascar? Only time will tell. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **37**: 405–431.

### **Image de couverture :**

The Biodiversity Sciences Technology group (BSCIT). *Calphotos* [en ligne]. Etats – unis, Université de Californie de Berkeley. <http://calphotos.berkeley.edu/> (Consulté le 06/04/2012).

## Annexe

**Annexe 1.** Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Biosprint 15 (QIAGEN).....22

**Annexe 2.** Caractéristiques des loci : Caractéristiques des loci chez *Olea europaea* : Amorces, gamme de taille des allèles, type de polymorphisme, localisation sur le génome et noms correspondant dans les anciennes publications .....27



**Annexe 1.** Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Biosprint 15 (QIAGEN).

### Broyage des échantillons pour une extraction avec le BioSprint 15 de Qiagen

1. Mettre environ 30 mg de feuilles séchées au silica gel dans un tube de 2mL.
2. Ajouter 2 billes en tungstène par tube.
3. Broyer 5 min à vitesse maximale (30Hz) dans le TissueLyser de Qiagen.

### Lyse des cellules pour une extraction d'ADN avec le BioSprint 15 de Qiagen

Pour la lyse des cellules, 2 protocoles peuvent être utilisés, celui de Maïlyn, ou celui de Darin.

#### Maïlyn

1. Ajouter 400 $\mu$ L de CTAB contenant 1% de PVP (polyvinyl-pyrrolidone) par tube de feuilles broyées.

2. Incuber 1h à 65°C.

3. Centrifuger les tubes 10 min à vitesse maximale.

4. Récupérer 200  $\mu$ L de surnageant pour l'extraction d'ADN avec le Biosprint.

#### Darin

1. Ajouter 800 $\mu$ L de CTAB et 10 $\mu$ L de Protéinase K à 100 mg/mL par tube de feuilles broyées.

2. Incuber 2h à 55°C.

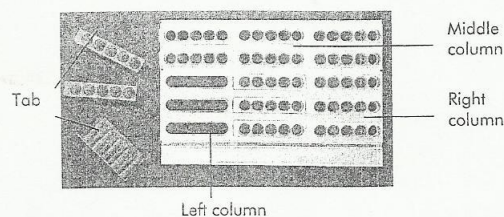
## Extraction d'ADN avec le BioSprint 15 Qiagen

Extraction de 15 échantillons en 15 min environ.

Attention : Lors de la première utilisation du kit d'extraction, compléter chaque bouteille de tampon RPW avec 125 mL d'isopropanol et 220  $\mu$ L de RNase A (1 tube). Conserver le tampon à 4°C.

1. Allumer le BioSprint 15
2. Ouvrir la porte située sur l'avant de l'appareil et sortir le support des trips.
3. Installer les 15 strips (barrettes de 5 tubes) sur le support, languette du strip sur la gauche (cf schéma ci-dessous). Un strip est utilisé par échantillon.

Correct Loading of 5-Tube Strips in the Tube Strip Tray



Si le nombre d'échantillons à extraire est inférieur ou égal à 5, les strips doivent être chargés sur une même colonne.

Si le nombre d'échantillons à extraire est inférieur ou égal à 10, les strips doivent être chargés sur deux colonnes.



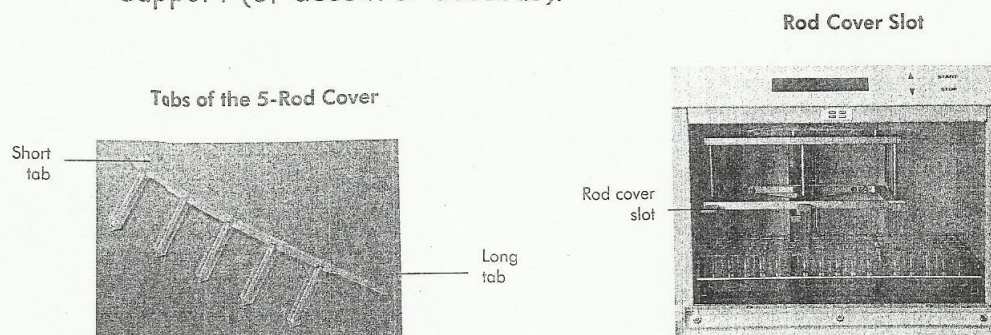
4. Ajouter les réactifs dans chaque tube, sur les strips, comme indiqué sur le tableau ci-dessous.

Well	Reagent	Volume of reagents ( $\mu$ l)
1	Isopropanol	200
1	MagAttract Suspension G	20
2	Buffer RPW	500
3	Ethanol (96-100%)	500
4	Ethanol (96-100%)	500
5	Distilled water or low-salt buffer	200

Avant d'ajouter la suspension G de MagAttract, s'assurer qu'elle est complètement resuspendue. Vortexer 3 min avant la première utilisation et 1 min avant les utilisations suivants.

Attention : Le puits 1 à gauche, sur le strip (du côté de la languette).

5. Transférer les 200  $\mu$ L de surnageant récupérés après la lyse dans le puits 1.
6. Installer les 3 « protections de barreaux aimantés » sur le support (cf dessin ci-dessous).



Si vous n'utilisez qu'une ou deux colonnes (extraction de 5 ou 10 échantillons), utilisez le nombre de protection adapté.

7. Installer le support de strip dans le BioSprint et fermer le capot.
8. Sélectionner le protocole « BS15 DNA Plant » et appuyer sur START.
9. Une fois le protocole terminé, appuyer sur STOP et retirer le support de strip de l'appareil. Transférer l'ADN élué du puits n°5 dans le microtube final.
10. Éliminer les strips et les protections de barreaux aimantés. Éteindre le BioSprint 15 ; Nettoyer le support de strip avec de l'éthanol 70%.

**Annexe 2. Caractéristiques des loci.** Caractéristiques des loci chez *Olea europaea* : Amorces, gamme de taille des allèles, type de polymorphisme, localisation sur le génome et noms correspondant dans les anciennes publications

Locus	Forward primer (5' ->3')	Revers primer (5' ->3')	Allele size range		Motif	Position	Region name	Locus name in previous studies	Ref.
5	tgtaaaacgacggccagtGAA AAAGGTTCTTATTTAGACATC	TATCTATTTGAAATCAGTGATGGG	98	99	polyT <sub>12-13</sub>	6820	rps16-trnQ	-	-
11	tgtaaaacgacggccagtAGA TAAAGGAAGGGCTCGAACG	CAGGCCATCAGAATAAGAAGGG	126	138	indel 10 bp + polyA <sub>11-14</sub>	9573	trnS-trnG	trnSG-indell, P12-P13	[2,6]
12	tgtaaaacgacggccagtGTT TCGCAATTCATAATCCAAC	GATTTAATCCTTTACCTCTCAATG	130	131	polyA <sub>7-8</sub>	10275	trnG intron	trnG-polyA	[2]
21	tgtaaaacgacggccagtCAT AGTTACAAACCCAAACAAAC	TCTTCCAAAAATCACAAGGAGTT	102	103	polyA <sub>9-10</sub>	31790	psbM-trnD	-	-
22	tgtaaaacgacggccagtGAA TATTAGAATCGCCACACTC	CAATCATTCCCTGAACAAATCC	156	159	polyA <sub>10-13</sub>	32680	trnE-trnT	trnDT-polyT, P20	[4,6]
24	tgtaaaacgacggccagtAGA TAGAACAAAGAAGACACTCAA	CCTCTTGTTTCGATTAATAATGTT	187	190	polyA <sub>11-14</sub>	34149	trnT-psbD	-	-
27	tgtaaaacgacggccagtCTC GGTTATGAGACACATTACAAT	CAAGAAGTTTGCAAGAAGTTTGAC	110	113	polyA <sub>8-11</sub>	38009	psbZ-trnG	P22	[6]
29	tgtaaaacgacggccagtGAA ACATAGCATCTGAGGTTG	TACCTATTACAGAGATGGTGTG	202	204	polyA <sub>10-12</sub>	46117	ycf3 intron 2	-	-
33	tgtaaaacgacggccagtAAT CAAATACGGGTTTCCGATAAG	ATACCAAGGCTCAATCCAATTAAG	234	236	polyT <sub>9-11</sub>	49018	trnT-trnL	trnTL-polyT	[1]
36	tgtaaaacgacggccagtTAC AACATATATCACTGTCAAGAG	TGAATGTTTGATTATTAGACCATGG	181	183	polyA <sub>6-7</sub> +A <sub>8-9</sub>	57113	atpB-rbcL	ccmp7, P28	[1,6]
41	tgtaaaacgacggccagtCAA ATCTTGATCTAGCTACAAGG	AAAGGTATCACATGGATCACTAG	169	172	polyA <sub>9-12</sub>	67877	psbE-petL	psbE-petL	[5]
43	tgtaaaacgacggccagtGTT TTGTTTCGACAAATCCGGG	TAATTTAAACGGAGTTCCCCGG	208	209	polyA <sub>9-10</sub>	71025	rps18-rpl20	-	-
44	tgtaaaacgacggccagtCGC GTGATGAAACGAAGAGA	CCATCTGGGTCTGATAGATTC	193	194	polyA <sub>8-9</sub>	72889	rps12-clpP	-	-
50	tgtaaaacgacggccagtGCG CCTAGAAGATATAAAACAG	AAAGCGAATTCTCCCTAGATACA	227	228	polyA <sub>12-13</sub> +A <sub>9-10</sub>	80449	petD-rps11	-	-
51	tgtaaaacgacggccagtGGT GAACTAAAATTATGGGTGC	TAGATTGTGTCTCACGCATATAC	139	146	polyT <sub>11-18</sub>	83109	rps8-rpl14	P31	[6]