



HAL
open science

Potentiel évolutif d'une population de hêtre commun sur le Mont Ventoux

Aurore Bontemps

► **To cite this version:**

Aurore Bontemps. Potentiel évolutif d'une population de hêtre commun sur le Mont Ventoux. Biodiversité et Ecologie. Université Paul Cézanne (Aix Marseille 3), 2012. Français. NNT : . tel-02810285

HAL Id: tel-02810285

<https://hal.inrae.fr/tel-02810285>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

UNIVERSITE PAUL-CEZANNE AIX-MARSEILLE

N°attribué par la bibliothèque

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'université Paul-Cézanne Aix-Marseille

préparée au laboratoire : **URFM-UR629-INRA Avignon**

dans le cadre de l'École Doctorale Sciences de l'Environnement

Spécialité : **Écologie**

Par

AURORE BONTEMPS

Potentiel évolutif d'une population de hêtre
commun sur le Mont Ventoux

Soutenue publiquement le 21 Septembre 2012 devant la commission d'examen :

Claire Damesin	Professeure, Université Paris VI	Présidente
Jacques David	Directeur de Recherche, SupAgro Montpellier	Rapporteur
Ivan Scotti	Directeur de Recherche, INRA-Guyane	Rapporteur
Catherine Bastien	Directrice de Recherche, INRA-Orléans	Examinatrice
Oliver Brendel	Chargé de Recherche, INRA-Nancy	Examineur
Bruno Fady	Directeur de Recherche, INRA-Avignon	Co-Directeur
Sylvie Oddou-Muratorio	Chargée de Recherche, INRA-Avignon	Directrice

RESUME :

L'évolution adaptative contribue probablement à l'adaptation des populations à des changements environnementaux rapides, l'observation empirique de nombreux cas d'évolution rapide dans les populations naturelles suivant de forts changements environnementaux abondant en ce sens. Dans cette thèse, je me suis concentrée sur l'estimation du potentiel évolutif d'une population naturelle de hêtre commun (*Fagus sylvatica*), une espèce à long cycle de vie, subissant des stress hydriques chroniques. Je considère ici une définition du potentiel évolutif dans le sens strict de la capacité d'une population à évoluer ; c'est donc un paramètre directement lié au taux d'évolution futur de la population considérée. Cette thèse a pour but d'apporter des éléments manquants concernant l'étude de l'adaptation chez les arbres, le rôle de l'évolution adaptative dans la capacité des arbres à composer avec les changements environnementaux futurs étant encore largement méconnu.

Pour cela, j'ai considéré quatre aspects principaux du potentiel évolutif (1) les patrons de variabilité phénotypique multivariée pour plusieurs traits fonctionnels foliaires la phénologie du débourrement végétatif, la masse surfacique et ses composantes la masse sèche et la surface, la composition isotopique de carbone ($\delta^{13}\text{C}$), la quantité d'azote et le contenu en eau et leurs effets sur la performance individuelle en termes de croissance et de production de graines ; (2) la variabilité génétique disponible pour la sélection pour ces traits (héritabilité et corrélations génétiques) ; (3) les flux de gènes réalisés par la dispersion locale des graines et du pollen ; (4) l'effet démographique des traits phénotypiques en termes de succès reproducteur relatif mesuré au stade semis de un an.

La population étudiée montre un potentiel évolutif important, imputable à divers traits (principalement la phénologie du débournement végétatif, et le Delta13C) qui présentent une diversité génétique élevée, sont soumis à une forte pression de sélection, et contribuent significativement à la valeur adaptative. Cette thèse appuie donc l'hypothèse selon laquelle l'évolution adaptative jouera un rôle important dans l'adaptation des arbres aux changements environnementaux futurs. Le rôle de la dispersion demeure incertain du fait d'une dispersion du pollen et des graines restreinte, mais également d'indices d'événements de dispersion à longue distances favorisés par la présence de mortalité densité dépendante.

Mots clefs : Potentiel évolutif, héritabilité in-situ, marqueurs moléculaires, analyses de parenté, succès reproducteur, dispersion, traits fonctionnels foliaires, hêtre.

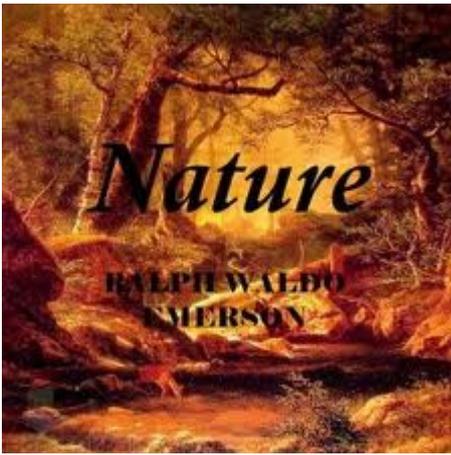
ABSTRACT:

Adaptive evolution may promote populations' adaptation to rapid environmental changes which is sustained by recurrent empirical demonstrations of rapid adaptive evolution in the wild consecutively to strong environmental changes. In this PhD, I focused on the estimation of the in-situ evolutionary potential of a wild European beech (*Fagus sylvatica*) population, a long-lived tree species, undergoing chronic water stresses. I here considered the evolutionary potential in the strict sense of "evolvability" i.e. the ability of population to evolve; this parameter is thus directly linked to the rate of future adaptive evolution. This PhD aimed to fill a gap in tree adaptation studies, the role of adaptive evolution in tree populations' ability to cope with future environmental changes remaining largely unresolved.

To that purpose, I focused on four main aspects of the evolutionary potential (1) patterns of multivariate phenotypic variability for several leaf functional traits i.e. leaf unfolding phenology, leaf mass per area and its components leaf dried mass and leaf area, carbon isotope composition, nitrogen content and leaf water content and its effect on tree performance in terms of growth and seed production; (2) the amount of standing genetic variation for these traits available to selection (heritability and genetic correlations); (3) the extent of gene flow contributed by local seed and pollen dispersal (4) the demographic effect of phenotypic traits in terms of relative reproductive success measured at the one-year seedling stage.

The studied a population displayed a high evolutionary potential because of a strong in-natura genetic variability of some traits and the relevance of these traits in trees adaptation, this PhD support the hypothesis that adaptive evolution is likely to play a key role in trees adaptation to future environmental changes. The role of dispersal remains unclear with apparently very restricted seed and pollen dispersal but also clues of long dispersal events promoted by the occurrence of density-dependent mortality.

Key words: Evolutionary potential, in-situ heritability, molecular markers, parentage analysis, reproductive success, dispersal, leaf functional traits, European beech.



" ... Crossing a bare common, in snow puddles, at twilight, under a clouded sky, without having in my thoughts any occurrence of special good fortune, I have enjoyed a perfect exhilaration. I am glad to the brink of fear. In the woods too, a man casts off his years, as the snake his slough, and at what period soever of life, is always a child. In the woods, is perpetual youth. Within these plantations of God, a decorum and sanctity reign, a perennial festival is dressed, and the guest sees not how he should tire of them in a thousand years. In the woods, we return to reason and faith. There I feel that nothing can befall me in life, -- no disgrace, no calamity, (leaving me my eyes,) which nature cannot repair. Standing on the bare ground, -- my head bathed by the blithe air, and uplifted into infinite space, -- all mean egotism vanishes. I become a transparent eye-ball; I am nothing; I see all; the currents of the Universal Being circulate through me; I am part or particle of God. The name of the nearest friend sounds then foreign and accidental: to be brothers, to be acquaintances, -- master or servant, is then a trifle and a disturbance. I am the lover of uncontained and immortal beauty. In the wilderness, I find something more dear and connate than in streets or villages. In the tranquil landscape, and especially in the distant line of the horizon, man beholds somewhat as beautiful as his own nature."

Ralph Waldo Emerson, 1803-1882

Table des matières

Introduction générale.....	9
1. Contexte théorique & expérimental.....	17
1.A) Problématique générale de la thèse : vitesse des processus évolutifs en milieu naturel.....	17
1) Evolution des traits quantitatifs en population naturelle.....	17
1.1) Réponse à la sélection et paramètres génétiques.....	17
1.2) Notion d'héritabilité.....	21
1.3) Notion de gradient de sélection.....	22
2) Étude de l'évolution des traits quantitatifs par une approche multitrait.....	24
2.1) Modélisation de la réponse à la sélection d'un ensemble de traits.....	24
2.2) Estimation des gradients de sélection en modèle multitrait.....	26
2.3) Sélection corrélée.....	27
3) Considérations sur les limites des études en population naturelle dans une démarche prédictive... 	28
3.1) Changements temporels de l'environnement.....	28
3.2) Changements temporels de la composition génétique.....	28
3.2) Biais d'estimation des gradients de sélection.....	29
5) Évolution contemporaine et changements globaux.....	30
6) Le cas particulier de l'adaptation à la sécheresse	31
1.B) Contexte expérimental ; Présentation de l'espèce et du site.....	34
1) Biologie et écologie du hêtre commun.....	34
1.1) Biologie.....	34
1.2) Écologie.....	34
2) Site étudié.....	35
2.1) Présentation.....	35
2.2) Climat.....	36
2.3) Placette d'étude.....	37
2) Variabilité des traits fonctionnels foliaires et performance des individus.....	42
Synthèse de l'étude.....	42
1) Contexte et principe.....	42
2) Résultats et discussion.....	43
3) Les traits fonctionnels étudiés.....	44
3.1) Phénologie du débourrement.....	45
3.2) Traits physiologiques foliaires.....	45
3.3) Traits morphologiques foliaires.....	47
Effet de syndromes de traits fonctionnels foliaires sur la performance: indices de sélection corrélée dans une population de hêtre commun en milieu sec.....	48
3) Héritabilité et corrélations génétiques de traits fonctionnels foliaires.....	80
Synthèse de l'étude.....	80

1) Contexte et objectif.....	80
2) Résultats et discussion.....	81
3) Méthodes.....	82
3.1) Estimation classique des paramètres génétiques	82
3.2) Estimations in-situ.....	86
Héritabilité et corrélations génétiques in-situ de traits écophysologiques foliaires dans une population de Fagus sylvatica exposée au stress hydrique.....	90
4) Évaluation de l'intensité des flux de gène par voie de pollen et de graine.....	122
Synthèse de l'étude.....	122
1) Contexte et objectif.....	122
2) Résultat et discussion.....	123
Estimation de la dispersion des graines à partir de génotypes de semis établis : est que la mortalité distance-dépendante a une influence ?.....	126
5) Estimation in-situ des gradients de sélection.....	166
1) Introduction.....	166
2) Matériel et méthode.....	170
2.1) Site d'étude et espèce étudiée.....	170
2.2) Génotypage.....	171
2.3) Description du modèle.....	171
2.4) Modèle pour la courbe de dispersion.....	174
2.5) Estimation de paramètres et comparaison des modèles	175
2.6) Gradients de sélection : standardisation.....	176
3) Résultats.....	177
3.1) Paramètres de dispersion et taux d'autofécondation.....	177
3.2) Différentielles de sélection et gradients de sélection.....	177
4) Discussion.....	183
Discussion générale.....	187
1) Étude in-situ de l'évolution contemporaine : aspects méthodologiques.....	187
1.1) Étude in-situ de la base génétique des caractères par la méthode de Ritland.....	188
1.2) Mesure de la force de la sélection par la régression trait/fitness.....	189
1.3) Mise en œuvre conjointe des mesures de sélection et de paramètres génétiques.....	191
2) Évolution de la population étudiée.....	192
2.1) Valeur adaptative et mécanismes évolutifs.....	192
2.2) Évolution future de la population étudiée.....	195
3) Potentiel évolutif des traits fonctionnels foliaires chez les arbres.....	199
Bibliographie.....	206

Introduction générale

Le point de vue selon lequel l'évolution est un processus lent a dominé pendant des décennies la pensée évolutionniste (Hendry & Kinnison 1999). Cette représentation de l'évolution est associée à l'émergence de la théorie de l'évolution par la sélection naturelle, ainsi Darwin écrit :

« We see nothing of these slow changes in process, until the hand of time has marked the long lapse of ages » (Darwin 1859, dans Hendry & Kinnison 1999).

Un fait intéressant pointé par Graham Bell (2010) est que Alfred Russel Wallace fut le seul contemporain de Darwin à critiquer cet aspect de sa théorie écrivant :

« Mr Darwin was rather inclined to exaggerate the necessary slowness of the action of natural selection ; but with the knowledge we now possess of the great amount and range of individual variation, there seems no difficulty in an amount of change, quite equivalent to that which usually distinguishes allied species, sometimes taking place in less than a century, should any rapid change in conditions necessitate an equally rapid adaptation » (Wallace 1889, dans Bell 2010).

De cette problématique de la vitesse de l'évolution découle la question fondamentale de l'échelle temporelle à laquelle il est possible d'observer la sélection naturelle et ses effets sur l'évolution des populations. Détecter des changements évolutifs sur l'espace de quelques générations permet de démontrer que le processus d'évolution peut être rapide. Ainsi, un nombre significatif d'études expérimentales en population naturelle ont documenté une évolution rapide de divers types de caractères phénotypiques en l'espace d'une dizaine de générations (Hendry & Kinnison 1999, Reznick & Ghalambor 2001). Par exemple, la date de mise bas chez l'écureuil du Yukon a avancé de 18 jours en 10 ans du fait du réchauffement climatique, 62% du changement phénotypique étant attribuable à la plasticité et 13% aux processus évolutifs (Bertheaux *et al.* 2004). Un autre exemple, concernant l'adaptation aux contraintes hydriques chez les plantes est donné par Franks (2011) qui démontre l'évolution sur une génération vers une phénologie de floraison précoce chez *Brassica rapa* consécutivement à un fort épisode de sécheresse (population 1 : 1.9 jours, population 2 : 8.6). Il existe d'autres exemples d'évolution rapide dans la littérature, souvent observés lors d'événements climatiques extrêmes ou d'introduction dans un nouvel environnement notamment.

Une autre façon de démontrer que l'évolution peut être rapide consiste à montrer que l'intensité de la sélection naturelle est forte (sachant que les traits sur lesquels elle s'exerce sont héréditaires, voir plus bas). Déterminer l'intensité de la sélection à l'œuvre dans les populations naturelles permet donc de comprendre mais aussi de prédire la vitesse de l'évolution. Endler (1986) synthétisa les premiers résultats sur l'intensité de la sélection naturelle disponibles au moment de l'étude. Il mit en évidence le fait que la sélection naturelle pouvait être forte et que c'était un phénomène probablement répandu. Ce constat eut par la suite pour effet de stimuler le développement de nombreuses études expérimentales sur la sélection naturelle. Par la suite, Kingsolver *et al.* (2001) proposèrent une méta-analyse des études de sélection naturelle publiées après l'étude d'Endler (1986). En ce qui concerne la sélection directionnelle (paramètre de sélection directement en lien avec le changement des moyennes génétiques), cette méta-analyse montre une distribution de type log-normal des intensités de sélection : avec une grande majorité de faibles intensités de sélection et quelques fortes valeurs, la médiane étant égale à 0.16 (Figure 1). Néanmoins, comme le fait remarquer Conner (2001), la notion de faible intensité est très relative, une intensité de sélection égale à la médiane considérée comme faible signifie qu'une augmentation de la valeur du trait égal à un écart-type est associé à une augmentation de 16% de la fitness relative.

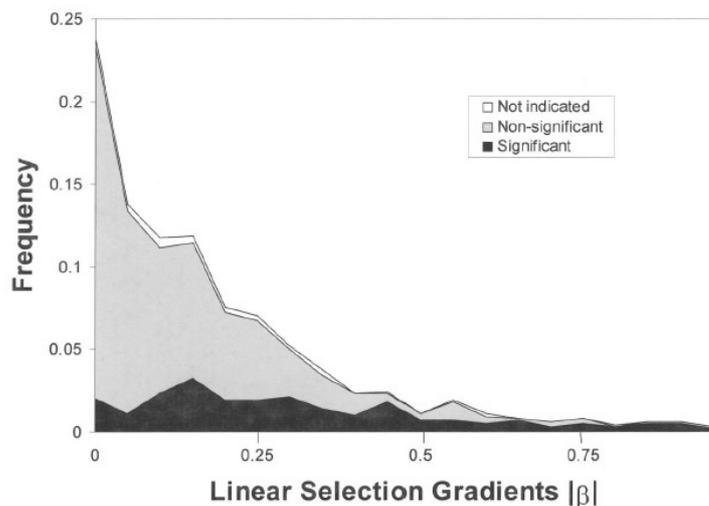


Figure 1 :

Distribution des intensités de sélection directionnelle $|\beta|$ (N=993).

Les distributions sont groupées par niveau de significativité statistique de l'estimation:

- Noir pour significatif au seuil de 5%
- Gris pour non significatif au seuil de 5%
- Blanc pour significativité non indiquée

Tiré de Kingsolver *et al.* (2001)

Malgré la forte prépondérance des faibles intensités de sélection, on observe un nombre non négligeable d'événements de forte sélection en populations naturelles. Néanmoins, une intensité de sélection naturelle forte ne suffit pas pour observer une évolution rapide des traits, cela impliquant également que les traits possèdent une variabilité génétique suffisante pour répondre à la sélection. Depuis quelques années, on assiste à un renouveau des études d'évolution (sélection et/ou variabilité génétique) sur des espèces variées, basées sur la mise en œuvre d'approches de génétique quantitative. L'utilisation de ces approches

en population naturelle a été favorisée par le développement récent d'outils permettant de traiter les défis méthodologiques spécifiques à ces études. En particulier, le développement de marqueurs moléculaires hautement variables comme les microsatellites ont permis la réalisation d'avancées majeures.

La question de la vitesse de l'évolution est fondamentale pour comprendre comment les populations répondent à des changements rapides des conditions environnementales. Dans le contexte actuel des changements globaux et des risques d'extinction des populations qui y sont associés, cette question suscite un regain d'intérêt notamment à cause du rôle que l'évolution peut jouer localement sur le maintien des populations. En plus de l'adaptation de la population au nouvel environnement grâce à l'évolution due à la sélection naturelle (Gnienapp *et al.* 2008), deux autres facteurs peuvent permettre aux populations naturelles de répondre aux nouvelles contraintes liées au changement temporel de leur environnement : (1) la migration vers des habitats favorables ; (2) un ajustement au nouvel environnement grâce à la plasticité phénotypique. Il est en fait probable que la persistance ou l'extinction des populations dépendra de l'interaction de ces trois facteurs (Davis & Shaw 2001) mais la question de leur importance relative reste largement ouverte. Le changement climatique se traduira a priori par des décalages importants des valeurs phénotypiques de la population avec le nouvel optimum induit par le changement des conditions environnementales et donc par une fitness de cette population réduite, on parle de fardeau de décalage (lag-load ; Bürger & Lynch 2005). Un décalage trop important peut emmener à l'extinction de la population. Le décalage entre les valeurs phénotypiques réalisées dans la population et la valeur phénotypique optimale à un instant donné doit être considéré d'un point de vue dynamique car il peut évoluer constamment sous l'effet des trois facteurs évoqués précédemment. Diverses études expérimentales suggèrent qu'à l'échelle de la génération le lag-load va être réduit par les capacités plastiques des populations, qui est donc le facteur principal permettant une adaptation (non génétique, pas de processus évolutif) des populations sur le court terme (Berteaux *et al.* 2004, Charmantier *et al.* 2008). Généralement, la capacité de la plasticité à compenser la diminution de la fitness est limitée et sur un plus long terme l'adaptation des populations fait également appel aux processus évolutifs ce qui emmène au changement de la valeur génétique de la population considérée. Par ailleurs, beaucoup d'études se sont intéressées à l'effet de la migration sur les capacités d'évolution des populations du fait de son possible impact sur la variabilité génétique. Cependant, pour beaucoup d'espèces, ces capacités de migration apparaissent limitées en regard de la rapidité des changements environnementaux annoncés et de la fragmentation accrue des milieux (Nathan *et al.* 2011).

Dans cette thèse, je m'intéresse à la vitesse de l'évolution et de la réduction du lag-load dans le cas particulier des populations d'arbres. Cette problématique est au cœur du projet interdisciplinaire de l'Unité de recherche d'écologie des Forêts Méditerranéennes (URFM) à l'INRA d'Avignon, unité dans laquelle cette thèse a été effectuée. Les arbres en tant que modèles biologiques présentent certaines caractéristiques ayant des impacts sur leurs capacités d'évolution (Petit & Hampe 2006, Kremer *et al.* 2012, Savolainen *et al.* 2007). Les caractéristiques les plus souvent invoquées sont un long cycle de vie, une forte fertilité, des flux de gène étendus (en particulier par voie pollinique), une grande taille efficace de population, une diversité génétique forte au sein des populations mais faible entre populations. Et notamment, leurs caractéristiques démographiques (long cycle de vie et faible mortalité adulte) pourraient accentuer le fardeau de décalage en limitant le nombre d'épisodes de sélection (Kramer 2008, Kuparinen *et al.* 2010). En revanche d'autres caractéristiques peuvent favoriser une adaptation rapide, en particulier la forte variabilité génétique présente au sein des populations et les grandes tailles de population augmentent les chances de présence de variabilité génétique favorable (allèles favorables et combinaison de gènes favorables ; Bridle & Vines 2007, Petit & Hampe 2005). D'ailleurs, de nombreux caractères montrent une différenciation génétique marquée le long de gradients environnementaux divers ce qui atteste de la capacité des arbres à s'adapter à des variations de l'environnement (Savolainen *et al.* 2007).

La migration des gènes (par graine et principalement par pollen chez les arbres) peut atténuer le phénomène de lag-load. En effet, du fait de leur adaptation à un climat localement hétérogène, la tolérance climatique des populations est souvent inférieure à l'enveloppe bioclimatique définie pour l'ensemble de l'espèce, ce qui s'observe fréquemment pour les populations d'arbres (Rehfeldt *et al.* 2002, Savolainen *et al.* 2007, Kremer *et al.* 2012). La migration des gènes dans un environnement spatialement et temporellement hétérogène peut alors promouvoir l'adaptation des populations en apportant dans la population focale des allèles pré-adaptés issus d'autres populations ayant déjà expérimenté les conditions environnementales nouvellement appliquées à la population focale (Kremer *et al.* 2012, Kuparinen *et al.* 2010). Chez les arbres en climat tempéré, le rôle fondamental du pollen est souvent mis en avant du fait de grandes capacités de dispersion à longue distance (Hamrick *et al.* 1992, Savolainen *et al.* 2007, Ashley *et al.* 2010, Robledo-Arnuncio 2011). De ce constat, on peut souligner l'importance majeure des populations les plus méridionales qui peuvent donc constituer une source de diversité génétique favorisant l'adaptation de populations plus septentrionales (Hampe & Petit 2005). À l'inverse les populations des marges méridionales vont à priori expérimenter des environnements nouveaux sans les effets bénéfiques sur le plan génétique de la dispersion (Davis *et al.* 2005, mais voir Alleaume-Benharira *et al.* 2006), ce qui les rend particulièrement sujettes à l'extinction et renforce le rôle de la variabilité génétique déjà présente. Alors que le rôle potentiel de la migration sur l'atténuation du phénomène de lag-load est depuis longtemps

envisagé en biologie évolutive théorique (Lenormand 2002), cette question demeure relativement peu abordée par les études expérimentales.

Malgré le caractère fondamental de l'estimation des capacités d'évolution des populations naturelles, il n'existe pour le moment que peu d'estimations réalisées en milieu naturel et ce principalement en raison de fortes contraintes méthodologiques. En effet, cela nécessite de connaître les relations d'apparentement de la population étudiée, dont l'acquisition peut se révéler être très coûteuse en temps et en ressources. Les approches classiques utilisées pour contourner ce problème consistent à étudier une population dont le pédigrée est connu en conditions contrôlées (typiquement, des descendance maternelles supposées être demi-frères en jardin commun). Cependant, d'une part, les résultats obtenus sont difficilement transposables au milieu naturel notamment à cause de la difficulté de rendre compte d'une variation environnementale réaliste (Conner 2003). D'autre part, chez les arbres, ce sont surtout des caractères exprimés aux stades juvéniles (semis) qui peuvent être étudiés, le nombre d'expérimentations au stade adulte disponible actuellement et pour lesquelles nous disposons de données de pédigrée étant limité. Il existe donc un besoin d'évaluer in-situ la variance génétique et l'héritabilité (synthétisées dans la suite du document sous le terme « base génétique ») des traits phénotypiques impliqués dans la réponse au climat et de tester les méthodologies qui ont été développées dans ce but.

Dans cette étude, je m'intéresse plus particulièrement à la problématique de l'adaptation des arbres à la sécheresse. En effet, le manque d'eau pose des contraintes majeures sur la performance des individus (leur croissance, reproduction et survie ; Bréda *et al.* 2006). Par ailleurs, du fait du changement climatique on attend une augmentation de la fréquence et de l'intensité des sécheresses en Europe et plus particulièrement en milieu méditerranéen (Giec 2007, Loarie *et al.* 2009). De forts taux de mortalité dans les populations d'arbres attribuables à des épisodes de sécheresse intenses sont déjà constatés (Cailleret *et al.* submitted, Nourtier *et al.* 2012). Des traits fonctionnels comme l'efficacité d'utilisation de l'eau et la masse surfacique foliaire sont considérés comme importants dans le processus d'adaptation au manque d'eau. Comme la majorité des traits adaptatifs, l'impact de ce type de trait fonctionnel sur la fitness peut être à la fois positif et négatif et la balance entre ces différents effets dépend fortement de l'environnement considéré. Ainsi, pour le moment, la valeur adaptative des traits fonctionnels est encore mal connue et la compréhension des potentialités d'adaptation des populations requiert d'identifier précisément les traits adaptatifs dans un environnement donné.

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer les bases génétiques et plastiques des mécanismes d'adaptation aux contraintes hydriques chez les arbres afin de quantifier les potentialités d'évolution d'une population de hêtre commun dans un environnement soumis à de fortes contraintes hydriques, et de formuler un premier scénario pour la réponse de populations de hêtre au changement climatique en contexte méditerranéen. Pour cela j'ai abordé successivement les questions suivantes (déclinées dans les différents chapitres de la thèse) :

- Comment les traits fonctionnels foliaires affectent la performance des individus en termes de croissance et de reproduction, et peut-on mettre en évidence des syndromes de traits ? (**Chapitre II**)
- Quel est la part de la variation phénotypique de ces traits qui est due à la variation génétique additive ? (**Chapitre III**)
- Quel est l'intensité des apports extérieurs de gènes par voie de pollen et de graine ? (**Chapitre IV**)
- Quelle est l'intensité de la sélection sur les traits phénotypiques qui influencent le succès reproducteur des individus ? (**Chapitre V**)
- Enfin, un axe majeur de la thèse développé dans l'ensemble des chapitres est celui de la possibilité d'aborder ces différentes questions par une approche in-situ.

La population de hêtre étudiée est située en région méditerranéenne sur le Mont Ventoux, c'est-à-dire en limite sud de l'aire de répartition de l'espèce. De plus, du fait de sa localisation dans la partie basse du gradient altitudinal, on considère qu'elle expérimente des conditions particulièrement contraignantes en terme de température et de disponibilité en eau. C'est une population jeune, en phase de recolonisation par régénération naturelle sous les reboisements de pins initiés dans la deuxième partie du 19^{ème} siècle (voir chapitre IB pour présentation détaillée de la population). Pour comprendre la capacité d'adaptation de la population étudiée à la sécheresse, je mènerai des approches de micro-évolution, c'est-à-dire que je focalise sur l'étude de l'évolution d'une population en intégrant une échelle de temps courte. Le chapitre IA est une synthèse bibliographique sur la problématique générale de la thèse, la vitesse des processus évolutifs en milieu naturel. J'y développe les questions qui sous tendent les études d'évolution des traits quantitatifs en milieu naturel, puis les questionnements récents concernant l'adaptation aux changements climatiques.

Chapitre 1.

Contexte théorique et expérimental

1. Contexte théorique & expérimental

1.A) *Problématique générale de la thèse : vitesse des processus évolutifs en milieu naturel*

1) Evolution des traits quantitatifs en population naturelle

1.1) Réponse à la sélection et paramètres génétiques

Si la capacité d'évolution rapide des populations naturelles peut encore être sujette à débat, les effets de la sélection artificielle le sont beaucoup moins. Ainsi, depuis un siècle, la science de la génétique quantitative et de l'amélioration génétique se sont conjointement développées, participant à l'élaboration de nouvelles variétés végétales et de races animales principalement dans un contexte agronomique (Fisher 1918, Gallais 1990). La génétique quantitative est une science dont l'objet est de modéliser l'hérédité des traits dits quantitatifs à déterminisme complexe à la fois multigénique et environnemental. Contrairement à la génétique des populations dont l'objet est de modéliser l'évolution du polymorphisme génétique sous l'effet des diverses forces évolutives que sont la sélection, la migration, la mutation, et la dérive, la génétique quantitative étudie l'évolution des valeurs phénotypiques de traits pour lesquels il est généralement impossible d'avoir accès au polymorphisme génétique.

Un objectif fondamental de la génétique quantitative est de prédire l'évolution des traits en réponse à la sélection d'origine environnementale et/ou anthropique. Un préalable est d'identifier la proportion de la variabilité phénotypique observée V_P qui est due à la variabilité génétique additive V_A (avec $V_P = V_A + V_E$; V_E : la variabilité environnementale ; pour une présentation de la notion de variabilité génétique additive et en général de la variabilité génétique, voir encadré A). Pour cela, un modèle de prédiction de la ressemblance phénotypique entre apparentés a été élaboré à partir des théories mendéliennes de la transmission des gènes comprenant comme paramètres les composantes de la variance phénotypique V_A et V_E (description méthodologique, voir chapitre 3).

Malgré un socle théorique commun, les outils de génétique quantitative utilisés pour prédire l'évolution des traits diffèrent selon que l'on étudie l'effet de la sélection naturelle ou l'effet d'une sélection artificielle. Dans le cas d'une sélection artificielle, la force de la sélection exercée par le sélectionneur est

classiquement mesurée par le différentiel de sélection (S) qui est la différence entre la moyenne phénotypique de la population parentale avant et après sélection. Ainsi, la réponse à la sélection (R) prédite par le modèle de la génétique quantitative, aussi appelé l'équation du sélectionneur (car initialement formulée dans le cadre agronomique de l'amélioration génétique) est :

$$R = h^2 S \quad \text{Équation 1,}$$

où h^2 est l'héritabilité au sens strict du trait phénotypique (le rapport de la variance génétique additive V_A et de V_p) et l'intensité de la sélection mesurée par le différentiel de sélection S .

Cette équation 1 est équivalente à :

$$R = i h \sigma_A \quad \text{Équation 2,}$$

Où, h est la racine carrée de l'héritabilité au sens strict, σ_A la racine de la variance génétique additive V_A (écart-type) et i l'intensité de sélection ($i = S/\sigma_p$; et σ_p est l'écart-type phénotypique)

Cette formulation met bien en évidence les trois conditions nécessaires pour qu'un trait évolue : qu'il soit variable ($\sigma_A > 0$), héritable ($h > 0$) et soumis à sélection (i non nul)

Ces formulations sont principalement utilisées dans le cas de la sélection artificielle exercée par l'homme du fait qu'elles font intervenir le différentiel de sélection. La force de la sélection naturelle est classiquement mesurée avec le gradient de sélection directionnelle β , c'est-à-dire le coefficient de régression de la valeur sélective sur le trait (voir paragraphe 1.3, chapitre 1.A). Ainsi, l'estimation de la réponse à la sélection en population naturelle fait intervenir une formulation permettant d'utiliser le paramètre β :

$$R = V_A \beta \quad \text{Équation 3}$$

L'objectif principal de cette thèse étant d'étudier le potentiel évolutif en population naturelle, c'est cette dernière formulation que l'on utilisera pour élaborer des hypothèses sur la trajectoire évolutive de la population étudiée. Il faut par ailleurs noter que ces équations correspondent à une prédiction de la réponse univariée des traits et peuvent être étendues au cas multivarié en tenant compte de l'influence des autres traits sous sélection par l'intermédiaire des corrélations génétiques (Lande & Arnold 1983, Morrissey *et al.* 2010), comme détaillé plus loin.

Encadré A : Effets additifs et variance génétique

Notion de l'effet moyen d'un gène (Verrier, Brabant & Galais, 2001) :

L'effet moyen d'un allèle est l'espérance centrée de la valeur phénotypique des individus ayant reçu cet allèle d'un de leurs parents, l'autre allèle étant tiré au hasard. Cet effet moyen est également désigné « effet additif » d'un allèle.

Pour un individu diploïde, c'est-à-dire possédant deux exemplaires d'un gène donné, la valeur génétique correspondant à un locus i sera :

$$G_{ij} = \mu_g + \alpha_i + \alpha_j + \delta_{ij}, \quad \text{Équation A1}$$

Avec, μ_g la moyenne phénotypique, α_i et α_j les effets additifs et δ_{ij} qui représente l'interaction entre les allèles i et j , appelée valeur ou résidu de dominance (=écart chez les hétérozygotes de la somme des effets additifs)

Pour définir les effets additifs, Fisher (1918) a utilisé la méthode des moindres carrés et minimise pour l'ensemble de la population, l'espérance du carré du résidu de dominance.

Notion de variance génétique (Lynch & Walsh 1998) :

La variance des valeurs génétique G_{ij} (équation A1) s'écrit :

$$\begin{aligned} \text{var}(G) &= \text{var}(\mu_g + \alpha_i + \alpha_j + \delta_{ij}), \quad \text{Équation A2} \\ &= \text{var}(\alpha_i + \alpha_j) + \text{var}(\delta_{ij}) \end{aligned}$$

L'équation 2 s'écrit : $V_G = V_A + V_D$

Avec V_G la variance génétique, V_A la variance génétique additive et V_D la variance de dominance.

Figure A2 : Évolution de V_G trait plein, de V_A trait en point tiré et de V_D trait en point tillés pour un gène possédant deux allèles B_1 et B_2 à la fréquence p_1 et p_2 .

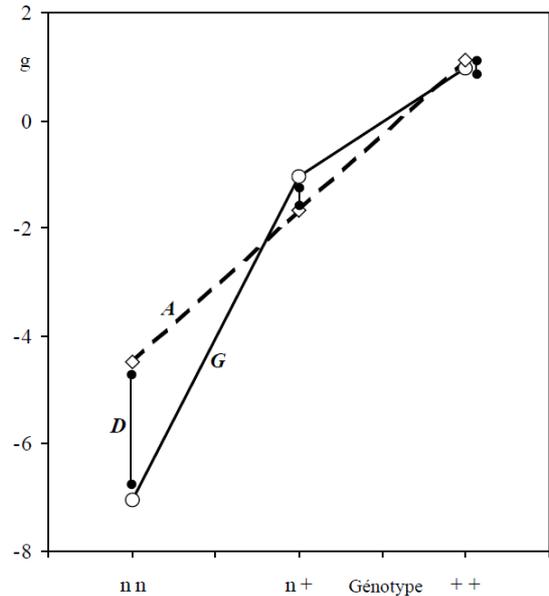
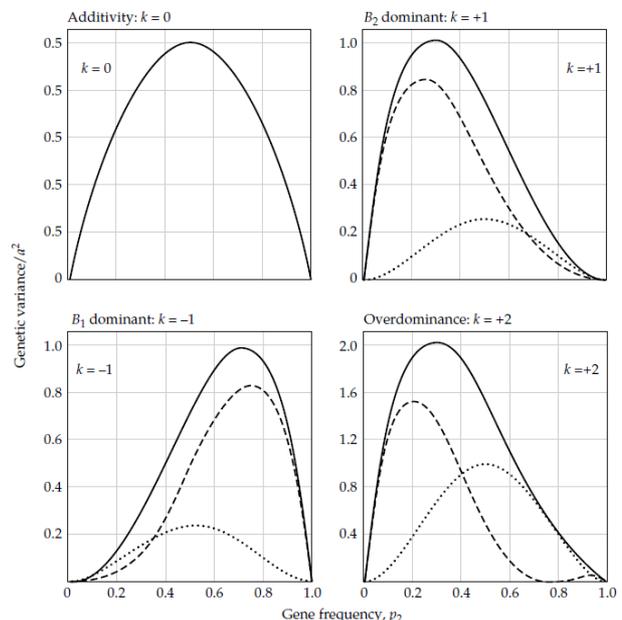


Figure A1 : Illustration des effets additifs (courbe A) et de dominance (valeur D) sur la valeur génétique (courbe G). Exemple chez le gène de nanisme chez la souris (fréquence de l'allèle nain n égal à 0.2)



1.2) Notion d'héritabilité

Comme nous l'avons vu, l'héritabilité est définie comme étant le rapport de la variance génétique additive avec la variance environnementale. Ainsi grossièrement, plus la variance génétique additive V_A est forte, c'est-à-dire plus l'expression de la variabilité génétique est importante et plus h^2 est élevée. A l'inverse, plus V_p est fort, c'est-à-dire plus la part de la variabilité phénotypique d'origine plastique est importante, moins est h^2 élevée.

En premier lieu, à fond génétique donné, l'estimation de h^2 peut dépendre de l'environnement que l'on considère. En effet, les facteurs environnementaux influent sur les composantes de la variance phénotypique V_A et V_E . Premièrement, l'expression de V_A peut dépendre de l'environnement lorsqu'il y a des effets d'interaction génotype-environnement (**GEI**). Ainsi à la figure 2, du fait d'une différence de valeur génétique plus importante, V_A est plus importante dans le milieu 1 que dans le milieu 2. Deuxièmement, l'hétérogénéité environnementale est aussi une source de variation de V_p et donc de h^2 .

Par ailleurs, une question fondamentale est celle de la variation de l'héritabilité et de la variance génétique additive entre des environnements dits favorables et contraignants (Hoffman & Merilä 1999, Charmantier & Garant 2005). La réponse à la sélection étant dépendante de la base génétique, il est possible que lorsque l'environnement se dégrade, h^2 et V_A ne soient plus suffisantes pour permettre une évolution des populations. Ainsi une hypothèse est que h^2 peut être plus faible en environnement contraint à cause de la forte expression de V_E , du fait de l'importance accrue des différences de qualité environnementale, mais aussi parce que le potentiel génétique des individus ne s'exprime pas pleinement du fait des limitations de ressources (Figure 3b). Mais des hypothèses inverses sont avancées et prédisent une augmentation de h^2 en environnement contraint (Figure 3a). Il est en fait très difficile de dégager des tendances nettes comme l'illustre la multiplicité des situations évoquée à la figure 3 et cela dépend probablement des traits étudiés, ainsi que de la gamme environnementale considérée (Brendel 2012).

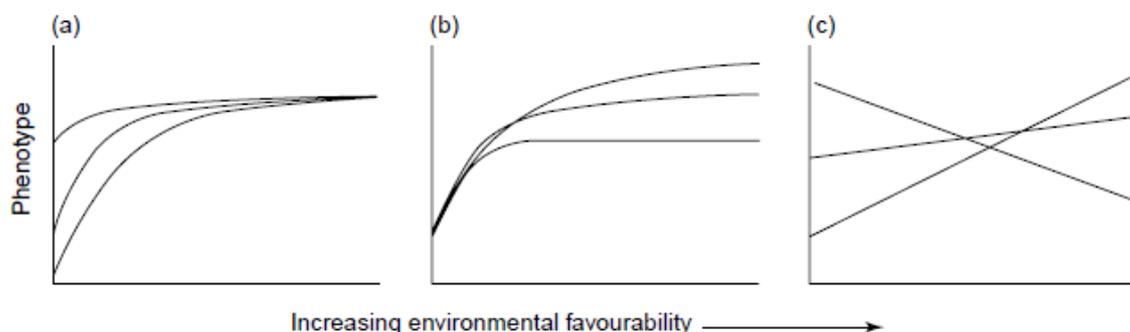


Figure 2 : Normes de réaction (une courbe = un génotype) pour divers types d'interaction génotype-environnement. Dans les trois cas **a**, **b** et **c** il y a des interactions génotype-environnement : la différence phénotypique entre génotypes dépend de la qualité environnementale (axe des x, environmental favourability). **a**, **b** et **c** diffèrent concernant l'effet de l'environnement sur la part de la variabilité génétique exprimée, **a** représente un cas où la variation phénotypique entre génotypes est inférieure en environnement favorable, **b** en environnement défavorable et **c** en situation intermédiaire.

a et **b** représentent à la fois une variabilité plastique accentuée en environnement défavorable (augmentation rapide du trait en environnement défavorable, relative stabilité en environnement favorable) .

Tiré de Hoffmann & Merilä 1999.

Une conséquence importante est que du fait de la sensibilité des valeurs de h^2 à l'environnement, il est difficile de transposer des valeurs estimées dans un environnement à un environnement différent. En particulier, les valeurs estimées en conditions contrôlées (laboratoire, jardin commun) peuvent produire des estimations supérieures de h^2 comparativement à des estimations menées en milieu naturel (Conner 2003, Wolkovich *et al.* 2012). Les études en jardin commun présentent différents avantages comparativement aux études in-situ, à savoir des contraintes méthodologiques liées à l'acquisition des pédigrées réduites, ainsi que la capacité à estimer la divergence génétique entre populations (Q_{ST}). Cependant, contrairement aux approches de génétique quantitative in-situ elles ne permettent pas de comprendre l'expression de la variabilité phénotypique en milieu naturel. Les approches de génétique quantitative in-situ et ex-situ apparaissent donc étroitement complémentaires dans l'étude du potentiel évolutif des populations naturelles.

1.3) Notion de gradient de sélection

La sélection se traduit par une variation de la valeur adaptative entre les différents génotypes de la population, la valeur adaptative ou fitness étant définie comme le nombre de descendant viables en état de se reproduire produit par un génotype. Ces différences de fitness peuvent résulter de différences de survie/mortalité, et/ou de différences de fertilité. L'intensité de la sélection s'exerçant sur un trait quantitatif est classiquement mesurée via la modélisation de la relation entre la fitness et le phénotype, et l'estimation des termes de cette relation. Classiquement, cette relation comprend deux paramètres appelés gradients de sélection, le gradient de sélection linéaire β et le gradient de sélection quadratique γ (Lande & Arnold 1983, Stinchcombe *et al.* 2008) :

$$w(P_i) = \alpha + \beta P_i + 1/2 \gamma (P_i)^2 + \epsilon_i \quad \text{Équation 4,}$$

Avec, $w(P_i)$ la fitness associée au phénotype P_i de l'individu i (P_i étant centré-réduit), α l'ordonnée à l'origine, β représente la composante linéaire de l'effet du phénotype sur la fitness (et la sélection directionnelle), alors que γ représente la composante quadratique de l'effet du phénotype sur la fitness (et la sélection stabilisante ou disruptive), ϵ_i est le terme d'erreur.

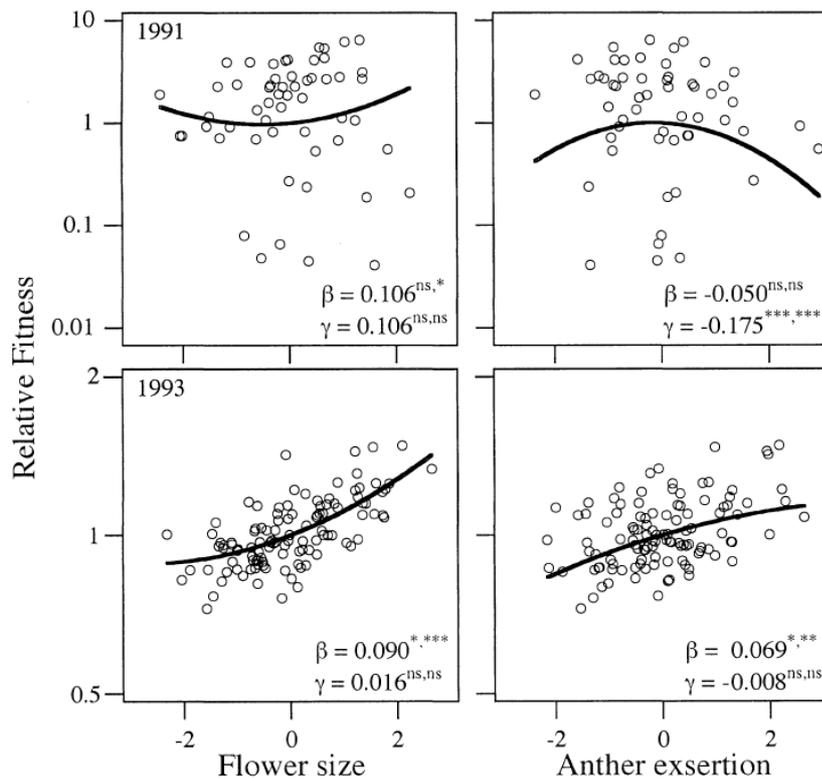


Figure 3 :

Sélection sur la taille des fleurs (gauche) et le dépassement des anthères (droite) pour l'année 1991 (haut) et 1993 (bas) chez *Raphanus raphanistrum* (Morgan & Conner 2001).

- β est le gradient de sélection directionnel.

- γ est le gradient de sélection quadratique.

Les lignes représentent la fonction de fitness estimée par un modèle de sélection multivariée incluant la configuration spatiale des parents (méthodologie : voir chapitre 4) ; les points représentent la fertilité estimée d'après le modèle.

Tiré de Morgan & Conner (2001)

Un caractère sera considéré sous sélection lorsqu'au moins un des gradients est significatif, la combinaison des deux gradients permettant de rendre compte des divers types de sélection. Un exemple de ces différents types de sélection sur des traits floraux est présenté à la figure 3 (Morgan & Conner 2001). Dans le cas de la sélection stabilisante (γ significatif et négatif), il existe une valeur de trait optimale conférant une fitness maximale, optimum vers lequel converge les phénotypes de la population à chaque génération de sélection. Ainsi, le dépassement (par rapport à la corolle) des anthères pour l'année 1991 est sous sélection stabilisante. Dans le cas d'une sélection directionnelle (β significatif), la valeur moyenne du trait se déplace vers une valeur optimale inconnue, comme cela est le cas pour la taille des fleurs et le dépassement des anthères pour l'année 1993. Enfin, le patron de sélection disruptive (γ significatif et positif) conduit à un déplacement des phénotypes vers deux optimums de valeur inconnue. Ainsi, le patron de sélection sur la taille des fleurs en 1991 s'approche d'un patron de sélection disruptive bien que γ ne soit pas significatif.

2) Étude de l'évolution des traits quantitatifs par une approche multitrait

2.1) Modélisation de la réponse à la sélection d'un ensemble de traits

Comme nous l'avons évoqué précédemment, lorsque la sélection agit simultanément sur plusieurs traits, il est nécessaire de se placer dans le cadre des analyses statistiques multivariées. En effet, le coefficient de la régression de la fitness sur un trait estimé avec un modèle de type univarié intègre à la fois les effets directs du trait sur la fitness mais aussi les effets indirects des autres traits sélectionnés via les corrélations phénotypiques (méthodologie d'estimation : voir le paragraphe 2.2, chapitre 1A). La sélection indirecte influence potentiellement l'évolution du trait mais seulement lorsque les deux traits co-sélectionnés sont liés génétiquement. Or, les modèles de prédiction présentés précédemment n'utilisent que les paramètres de sélection directe. Il est donc utile de pouvoir séparer les effets directs des effets indirects de la sélection. Par exemple, si l'on considère un trait Y sélectionné et corrélé génétiquement avec un trait X, sélectionné également, on obtient l'équation suivante :

$$R_Y = V_{A(Y)}\beta_Y + Cov_{A(XY)}\beta_X, \text{ Équation 5}$$

Où, $V_{A(Y)}$ est la variance génétique additive de Y, $Cov_{A(XY)}$ est la covariance génétique additive de X et de Y et β_Y/β_X sont les gradients de sélection s'exerçant sur les traits Y et X respectivement.

On constate donc que l'évolution du trait Y dépend non seulement de son effet sur la valeur sélective des individus (β_Y) tout comme dans l'équation 3, mais également de l'effet du trait X sur la valeur sélective (β_X) qui se propage via la liaison génétique entre X et Y. On peut généraliser l'équation 4 à un nombre N de traits corrélés génétiquement, l'équation du sélectionneur devient (Lande & Arnold 1983) :

$$\Delta \bar{z} = GP^{-1} s = G \beta \quad \text{Équation 6,}$$

Où \bar{z} est le vecteur de la moyenne des traits, G est la matrice des variances-covariances additives génétiques, P est la matrice des variances-covariances phénotypiques, s le vecteur des différentielles de sélection et $\beta = P^{-1}s$ est le vecteur des gradients de sélection.

La sélection simultanée de traits corrélés est a priori un phénomène extrêmement répandu en milieu naturel. Ainsi la méthodologie de la mesure simultanée de la sélection sur plusieurs traits développée par Lande & Arnold (1983) est à présent couramment utilisée dans les études de sélection naturelle (Kingsolver *et al.* 2001). Ainsi si l'on considère que l'ensemble des traits impliqués dans la sélection et potentiellement corrélés ont été identifiés, alors cette méthode a l'avantage d'évaluer la valeur adaptative d'un trait sans biais. Bien sur, cela est en pratique quasiment irréalisable, ce qui implique que les mesures de sélection ne sont jamais complètement dépourvues de biais (Price 1970, Morrissey *et al.* 2010).

Lande & Arnold (1983) soulignent que la mesure fiable de la sélection est cruciale au regard des critiques qu'ont pu recevoir les évolutionnistes à propos d'interprétations adaptationistes systématiques, ces mesures fiables constituant selon eux la meilleure réponse à ces critiques. Mais la mesure de la sélection simultanée de traits corrélés peut être aussi utilisée à d'autres fins ; par exemple, un des défis actuels en biologie évolutive est de comprendre comment le processus d'adaptation peut échouer et la présence de corrélations génétiques défavorables entre traits co-sélectionnés est une hypothèse majeure (Etterson & Shaw 2001, Blows & Hoffman 2005, Agrawal *et al.* 2009, Futuyma 2010, Conner 2012). L'estimation des gradients de sélection conjointement, à l'estimation des paramètres génétiques d'héritabilité et de corrélation génétique est une des manières de traiter cette question.

Cependant il faut noter que les corrélations génétiques défavorables n'empêchent pas nécessairement la réponse à la sélection (Delph *et al.* 2011, Conner *et al.* 2011, Conner 2012). Ainsi Conner *et al.* (2011) dans une étude de sélection artificielle chez *Raphanus raphanistrum*, démontrent une évolution rapide du dépassement des anthères malgré une sélection s'exerçant perpendiculairement à l'axe majeur de covariation longueur des étamines-longueur du tube corollaire (Figure 4). La contrainte sur la réponse à la sélection dépend notamment de la nature de la corrélation génétique, du déséquilibre de liaison (contrainte surmontable) et de la pléiotropie.

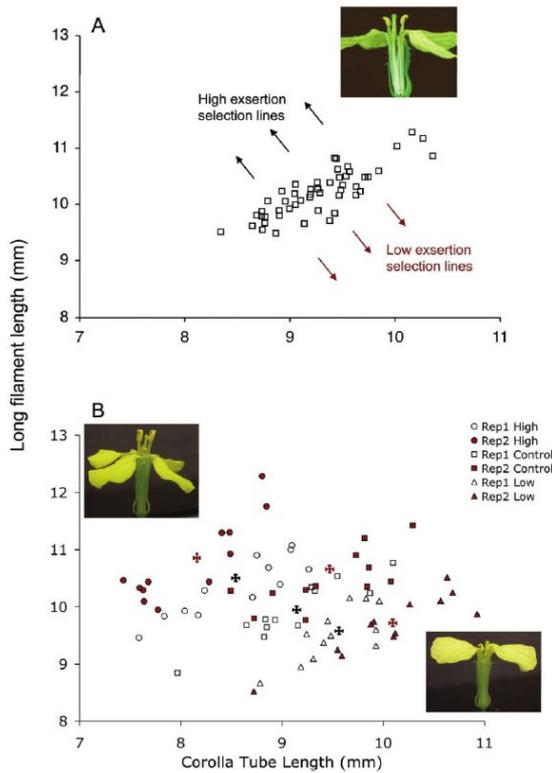


Figure 4 :

Valeur moyenne de familles de demi-frères pour la longueur des étamines et la longueur du tube corolaire, représentant les corrélations génétiques additives pour une population naturelle de *Raphanus raphanistrum* avant sélection (A). Les flèches noires représentent deux lignées de sélection vers un fort dépassement des anthères (High). Les flèches rouges représentent deux lignées de sélection vers un faible dépassement des anthères (Low). Deux lignées ont été utilisées sans appliquer de sélection (Control).

Tiré de Conner *et al.* 2011

2.2) Estimation des gradients de sélection en modèle multitrait

La méthode de la régression multiple permet de tenir compte de l'effet des corrélations phénotypiques sur l'estimation des gradients de sélection. Ainsi dans la méthode de la régression multiple, l'ensemble des traits sélectionnés sont utilisés conjointement pour prédire la fitness, le modèle inclue donc des coefficients qui mesurent l'action directe des traits sur la fitness, c'est-à-dire des gradients de sélection (Lande & Arnold 1983). Par exemple pour deux traits, le modèle s'écrit :

$$w(P_{A_i}, P_{B_i}) = \alpha + \beta_A P_{A_i} + \beta_B P_{B_i} + 1/2 \gamma_A (P_{A_i})^2 + 1/2 \gamma_B (P_{B_i})^2 + \epsilon_i$$

Équation 7,

Avec, $w(P_{A_i}, P_{B_i})$ la fitness de l'individu i ayant le phénotype combinant les traits A et B, β_A et β_B les gradients de sélection directionnels des traits A et B, γ_A et γ_B les gradients de sélection quadratique des traits A et B.

Il s'agit en fait d'un cas particulier de mesure de la sélection développé par Lande & Arnold (1983), le modèle général incluant un paramètre de sélection corrélé (Stinchombe *et al.* 2008). Ce modèle est présenté dans le paragraphe suivant.

2.3) Sélection corrélée

Dans le paragraphe précédent, nous avons envisagé les corrélations génétiques sous l'angle de leurs effets sur la réponse à la sélection. Elles peuvent également être la cible de la sélection et c'est ce point que nous développerons dans ce paragraphe (Sinervo & Svensson 2002, Delph *et al.* 2011, Donovan *et al.* 2011).

La sélection naturelle peut favoriser un sous-échantillon de combinaison de traits phénotypiques parmi l'ensemble des combinaisons possibles, ce qui se traduit par un effet adaptatif des traits qui dépend des autres traits, on parle alors de sélection corrélée. La notion de sélection corrélée est liée à la notion de paysage adaptatif et en particulier à celle de pic de fitness. À court terme cela peut induire des déséquilibres de liaison et à long terme si la sélection constante dans le temps, il a été théorisé que cela induise des effets de type pléiotropes (Sinervo & Svensson 2002).

Pour détecter si la sélection corrélée agit sur le jeu de traits mesurés, il faut se replacer dans le cadre de la mesure de la sélection de Lande & Arnold (1983, voir paragraphe précédent) en ajoutant aux effets additifs directionnels et quadratiques, des effets d'interaction entre les traits. Si les effets d'interaction sont significatifs, cela indique que la variation de fitness n'est pas simplement due à l'effet additif des traits mais que l'ensemble des traits déterminent conjointement la fitness. Pour deux traits A et B, la fonction de fitness s'écrira donc de la façon suivante (Lande & Arnold 1983, Maad 2000, Stinchombe *et al.* 2008) :

$$w(P_{A_i}, P_{B_i}) = \alpha + \beta_A P_{A_i} + \beta_B P_{B_i} + 1/2 \gamma_A (P_{A_i})^2 + 1/2 \gamma_B (P_{B_i})^2 + \rho_{AB} P_{A_i} P_{B_i} + \epsilon_i$$

Équation 8,

Avec ρ_{AB} le terme d'interaction entre les traits A et B.

Pour l'instant peu d'études s'attachent à détecter ce phénomène dans les populations naturelles et l'effet d'un trait sur la valeur sélective est souvent considéré comme indépendant des autres traits. Dans un article d'opinion concernant les stratégies de traits foliaires morphologiques et écophysiologicals, Donovan *et al.* (2011) soutiennent que ce type d'étude pourrait aider à séparer les causes évolutives des effets dus aux contraintes biophysiques, biomécaniques et génétiques. Les quelques études réalisées sur les traits

écophysiologiques mais aussi sur d'autres traits ou chez des animaux suggèrent que ce type de sélection serait courant dans la nature (Dudley 1996, Maad 2000, Sinervo & Svensson 2002, Donovan *et al.* 2011).

3) Considérations sur les limites des études en population naturelle dans une démarche prédictive

3.1) Changements temporels de l'environnement

Une conséquence de la variation de l'expression de la variabilité phénotypique avec l'environnement est que lorsque l'environnement change dans le temps, les paramètres déterminant l'expression la variabilité phénotypique varient aussi dans le temps. Ainsi les changements prédits sur les valeurs phénotypiques peuvent différer des changements effectivement observés (Gnienapp *et al.* 2008, Ozgul *et al.* 2009). En particulier, un phénomène d'acclimatation, résultat de la plasticité phénotypique, peut s'observer qui se traduit par un changement de la valeur des traits due au changement environnemental. Les effets environnementaux et génétiques se confondant, il est parfois difficile de mettre en évidence une réponse évolutive des populations, on parle alors d'évolution cryptique (Merilä *et al.* 2001). Par exemple, Merilä *et al.* (2001) ont mis en évidence chez *Ficedula albicollis*, une décroissance du poids des individus à l'envol, due à la dégradation de l'environnement conjointement à une augmentation de la valeur génétique due à une sélection directionnelle vers de forts poids à l'envol. La mise en évidence d'évolution génétique en environnement changeant requiert d'utiliser des méthodes permettant de séparer les deux types de réponse (Gnienapp *et al.* 2008, Hansen *et al.* 2012). Ceci peut en retour avoir des conséquences sur les prédictions d'évolution obtenues à partir de paramètres génétiques calculées sur des populations actuelles qui doivent donc tenir compte des phénomènes d'acclimatation. Par ailleurs, comme cela a été évoqué précédemment, les valeurs d'héritabilité peuvent varier avec l'environnement. Ainsi Charmantier & Garant (2005) recommandent de tenir compte de cette possibilité dans les modèles d'évolution. Cette problématique conforte la nécessité de replacer la mesure de l'héritabilité dans un contexte environnemental.

3.2) Changements temporels de la composition génétique

Un autre problème lié à la variabilité spatiale de l'environnement est celui de populations connectées par des flux de gènes et qui présentent une variation des fréquences alléliques (adaptation locale, dérive

génétique). Les flux de gènes qui homogénéisent les fréquences génétiques peuvent faire dévier les prédictions basées sur une estimation de la variation génétique observée dans les populations. Dans le cas particulier de l'adaptation locale, il semble que cela peut avoir des effets importants notamment sur les populations périphériques que les modèles théoriques prédisent comme étant particulièrement sensibles aux flux de gènes venant du centre de l'aire (Alleaume-Benharira *et al.* 2006, Kremer *et al.* 2012).

Par ailleurs, du fait même de la sélection, les fréquences alléliques vont varier au cours des générations successives et cela aura non seulement des conséquences sur la moyenne de la population (équation 1), mais cela en aura aussi probablement sur V_A (Hoffmann & Merilä 1999, Le Rouzic & Carlborg 2008). Il est ainsi notoire que le modèle de prédiction de la réponse à la sélection est efficace sur le court terme mais pas sur le long terme.

3.2) *Biais d'estimation des gradients de sélection*

L'environnement peut influencer simultanément l'expression des traits ainsi que la fitness, par exemple lorsque la qualité environnementale est hétérogène, cela a pour effet d'induire des covariances trait-fitness d'origine environnementale (Rausher 1992). Si ces covariances ne sont pas prises en compte, elles se confondent avec celles dues à l'effet adaptatif des traits et cela peut biaiser les mesures de la sélection. Par exemple, si la disponibilité en eau du sol détermine à la fois la production de graines, mais aussi l'efficacité d'utilisation de l'eau, alors une part de la covariation de ces deux traits sera due à l'hétérogénéité en eau du sol. Si cette hétérogénéité n'est pas connue, alors la covariation entre la production de graines et l'efficacité d'utilisation de l'eau due à l'effet sélectif va se confondre avec celle due à l'effet environnemental. Dans les études en populations naturelles, les effets de covariance environnementale trait-fitness sont probablement répandus du fait de la forte hétérogénéité environnementale caractérisant les milieux naturels. Ses effets sur l'inférence de la sélection ne doivent donc pas être négligés par les expérimentateurs.

Pour s'affranchir de ce problème, Rausher (1992) a développé une méthodologie consistant à substituer les valeurs génétiques (« breeding values ») aux valeurs phénotypiques. Cependant plusieurs difficultés sont inhérentes à l'application de cette méthodologie. Premièrement, il faut évidemment que la population ait un niveau suffisant de variabilité génétique (Agrawal *et al.* 2008). Deuxièmement, la taille de l'échantillonnage requis pour cette analyse est difficile à atteindre dans les études de sélection naturelle. Par ailleurs, une étude de sélection peut avoir plusieurs objectifs. Il peut être de caractériser l'action de la sélection et dans ce cas la mise en œuvre d'analyses statistiques pointues permettant de séparer les différents effets est pertinent. Mais comme le soulignent Wade & Kalitz (1990), l'objectif peut aussi être d'évaluer la sélection s'exerçant dans un contexte écologique donné et de lier la valeur adaptative des traits

à un environnement donné. Dans ce dernier cas, il est parfois plus pertinent de caractériser les variations de l'environnement et la variation concomitante des gradients de sélection, ce qui permet d'identifier directement les causes de la sélection.

5) Évolution contemporaine et changements globaux

La question de la capacité d'évolution rapide des populations revêt dans le contexte actuel une importance fondamentale pour comprendre et prédire la réponse des espèces aux changements globaux d'origine anthropique. En effet, le changement considérable de l'environnement observé et attendu se traduit par une modification des pressions de sélection ; une réponse évolutive des populations peut potentiellement aider à limiter son impact négatif (Davis *et al.* 2001, Hoffman & Sgro 2011). Ainsi, l'évaluation de la réponse évolutive des populations est depuis les dernières années un sujet d'intérêt majeur chez les évolutionnistes et de façon plus générale chez les écologues, comme le dénote l'accumulation récente d'études empiriques d'évolution contemporaine et de revues dévolues à ce sujet (Hansen *et al.* 2012).

Il est probable que l'intérêt premier de ces études pour les évolutionnistes a été de profiter des conditions d'expérimentation induites par des changements majeurs des pressions de sélection pour tester in-situ les hypothèses sur la rapidité de l'évolution des populations. Cependant, les conclusions de ces études permettent de répondre aussi aux préoccupations liées à la conservation des espèces. Ainsi ayant fait un état des lieux de ces études, Hansen *et al.* (2012) concluent que l'évaluation des changements évolutifs peuvent être un outil majeur de la prédiction de la persistance des populations et encouragent le développement de veille génétique des populations soumises à des changements drastiques de l'environnement, proposant des recommandations pour mener ces études à bien.

Ainsi, on anticipe une augmentation considérable de la force de la sélection ce qui en théorie promeut l'évolution des populations. Cependant, il est difficile de dire si les populations possèdent d'ores et déjà pour les différents traits contribuant à la fitness une variabilité génétique et une héritabilité qui leur permettra une réponse suffisante au regard des exigences d'adaptation qu'imposera le changement climatique. Pour répondre à cette question, il est fondamental d'une part d'approfondir les connaissances en termes de mécanisme d'adaptation aux facteurs climatiques et d'autres part de la base génétique de cette adaptation.

Par ailleurs, l'augmentation des températures se traduira dans certaines régions par une dégradation des conditions environnementales, en notamment en région méditerranéenne où l'on attend une augmentation de la fréquence et de l'intensité des sécheresses. A priori, cela va se traduire par un taux de mortalité accru. Parallèlement aux problèmes évoqués de changement de h^2 et de V_A avec la dégradation des conditions environnementales, cela pose aussi le problème de la régénération des populations. En effet, dans le cas où la valeur génétique des populations est trop éloignée de l'optimum, le taux de mortalité devient trop important pour être soutenable et la population fait alors face à un risque majeur d'extinction. Ainsi, dans la littérature le taux d'évolution maximal annoncé comme soutenable est de 0.1 haldane (Bürger & Lynch 1995). Les conséquences démographiques d'un taux de mortalité important peuvent aussi permettre une réponse à la sélection accélérée (on parle de sauvetage adaptatif, « evolutionary rescue », Gomulkiewicz & Holt 1995), mais l'importance de ce phénomène dans les populations naturelles reste largement méconnu. Différentes approches, comme les études d'association, permettent de faire des inférences sur les processus de sélection passés. Je m'intéresserai ici à l'étude instantanée de la sélection contemporaine en mesurant les paramètres de diversité génétique (V_A , h^2 , corrélations génétiques) et les gradients de sélection.

6) Le cas particulier de l'adaptation à la sécheresse

Chez les plantes, l'assimilation du carbone grâce à la photosynthèse est essentielle à la réalisation de la fitness, c'est-à-dire à la croissance, la reproduction et la survie. Le manque d'eau inhérent aux épisodes de sécheresse peut se traduire par des contraintes sur l'assimilation de carbone en diminuant les ressources nécessaires à la transpiration des plantes (Bréda *et al.* 2006, McDowell *et al.* 2008). Des diminutions de productivité primaire ont d'ores et déjà été constatées suite à des sécheresses intenses comme celle à laquelle l'Europe a fait face en 2003 (Ciais *et al.* 2005, Granier *et al.* 2007). Les plantes soumises à un fort stress hydrique sont sujettes à des dysfonctionnements hydriques lorsque la transpiration est trop intense, ce qui peut affecter la survie (McDowell *et al.* 2008, Hoffman *et al.* 2011). La transpiration est typiquement régulée par un ajustement des traits foliaires morphologiques et/ou physiologiques (Cochard *et al.* 1996, Maherali *et al.* 2005, Bréda *et al.* 2006). Par exemple, en climat méditerranéen on observe des feuilles épaisses, à faible surface et à conductance stomatique réduite en cas de déficit hydrique.

L'effet bénéfique de tels ajustements est à relativiser du fait de leur impact négatif sur l'assimilation de carbone (Rambal *et al.* 2003). En théorie, cet impact négatif peut être compensé par l'ajustement d'autres

traits foliaires comme la teneur en azote, ce qui a pour effet d'augmenter le ratio de carbone assimilé par unité d'eau transpirée. Des traits comme la masse surfacique et l'efficacité d'utilisation de l'eau ont une valeur intégratrice, leur variation pouvant refléter à la fois des variations de transpiration et du taux d'assimilation de carbone. La valeur adaptative des traits foliaires dépendra de la combinaison de leurs effets respectifs sur la fitness.

Pour le moment, peu d'études d'évolution contemporaine ont été menées pour tester la valeur adaptative des traits fonctionnels foliaires dans des milieux subissant des stress hydriques et elles concernent principalement des espèces herbacées pérennes (pour un exemple chez les arbres, voir Ramirez-Valiente *et al.* 2011). Même si, il est à noter que les conditions de milieu peuvent être extrêmes (par exemple, chez Donovan *et al.* (2009) *Helianthus anomalus* et *Helianthus deserticola* poussent en milieu désertique), les traits fonctionnels foliaires semblent expérimenter fréquemment de la sélection (Agrawal *et al.* 2008, Donovan *et al.* 2009).

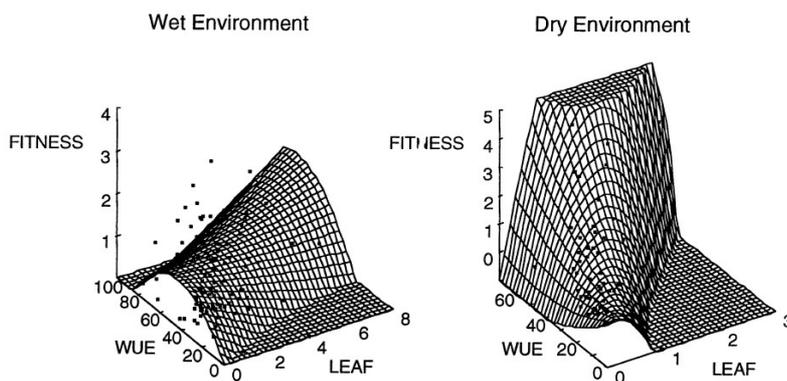


Figure 6 :

Paysage adaptatif impliquant deux traits, la taille des feuilles (LEAF) et l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) chez deux populations de *Cakile edentula*, l'une poussant en milieu humide (gauche) et l'autre poussant en milieu sec (droite).

Tiré de Dudley (1996)

Par ailleurs, la nature de la combinaison des traits n'est pas anodine et les traits semblent interagir dans le déterminisme qu'ils exercent sur la fitness (Donovan *et al.* 2011). Par exemple, dans une étude fondatrice, Dudley (1996) évalue l'effet de la taille des feuilles et de l'efficacité d'utilisation de l'eau sur la fitness en milieu sec et humide chez *Cakile edentula* (Figure 6). Si l'effet des traits était totalement indépendants, alors la forme de la fonction de fitness d'un trait serait constante quelle que soit la valeur de l'autre trait. Or la forme de la surface de fitness est bien plus complexe, ce qui indique que l'effet d'un trait sur la fitness dépend de la valeur de l'autre trait.

1.B) Contexte expérimental ; Présentation de l'espèce et du site

1) Biologie et écologie du hêtre commun

1.1) Biologie

Le hêtre commun, *Fagus sylvatica*, appartient à la famille des Fagacées, tout comme les chênes et le châtaignier. Le hêtre peut vivre 250 ans et plus mais il est habituellement exploité entre 80 et 120 ans. C'est une espèce monoïque, dont le mode de pollinisation est anémophile. La fécondation est principalement allogame, bien qu'il soit capable d'autofécondation (en condition contrôlées : Nielsen & Shaffalitzky de Muckadell 1954 ; en conditions naturelles : Piotti *et al.* 2012 , Gauzère 2011). Les graines appelées fâines sont typiquement contenues par deux voire trois dans une capsule appelée cupule. Elles sont relativement lourdes et très riches en lipides et en azote (Jensen 1985). La dispersion primaire est barochore et la dispersion secondaire est zoochore assurée par une guilda d'animaux cacheurs de graines (Nilsson, 1985). La fructification débute entre 40 et 50 ans en milieu ouvert et 60-80 ans en milieu fermé. L'abondance des fructifications (ou fâinées) entre années est très variable, les années de très forte fructification ou « masting » ayant lieu à une fréquence de 5-10 ans (Von Wuelisch 2008).

1.2) Écologie

Le hêtre est une espèce tolérante à l'ombre et cette propriété lui confère de bonnes capacités de compétition vis-à-vis des autres espèces durant la phase de régénération, ce qui en fait une espèce dominante dans une majorité des peuplements (Von Wuelisch 2003). L'aire de répartition du hêtre est très large et s'étend du nord des régions méditerranéennes au sud de la Scandinavie (Figure 7). C'est une espèce de plaine dans la partie nord de son aire de répartition, alors que dans la partie sud on le trouve plutôt en altitude. La présence du hêtre est fortement liée aux facteurs hydriques. En effet, d'une part il est connu pour être sensible aux sécheresses et en particulier aux sécheresses estivales (Sykes *et al.* 1996, Michelot *et al.* 2012, Silva *et al.* 2012). Ainsi, en zone méditerranéenne dans la limite sud de son aire de répartition, il se trouve dans un climat particulièrement contraignant. Il semblerait que les populations du sud soient plus résistantes à la sécheresse, cependant, l'origine de cette résistance (génétique ou acclimatation) n'est pas connue. En revanche, concernant la phénologie du débourrement de nombreux travaux ont été menés chez cette espèce et nous avons à présent une bonne image de la diversité génétique pour ce trait sur l'aire de répartition. Ces études mettent en particulier en évidence le rôle majeur de l'occurrence de gels tardifs

retardant la date de débourrement (Tessier du Cros *et al.* 1988, Von Wüelisch *et al.* 1995, Vitasse *et al.* 2010).

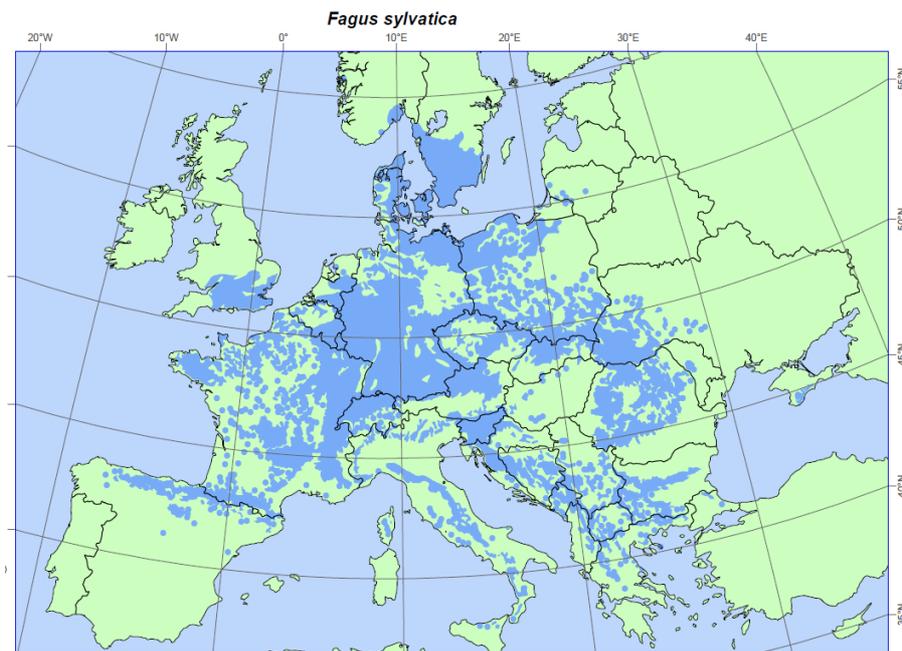


Figure 7 : Distribution du hêtre (*Fagus sylvatica*) en Europe.

EUFORGEN 2009. www.euforgen.org/distribution_maps.html

2) Site étudié

2.1) Présentation

Sur le mont Ventoux, qui se situe à la limite sud occidentale des Préalpes méridionales, le hêtre est donc à la limite sud de son aire de répartition. Le Ventoux culmine à 1909m et s'étale de 24 km d'ouest en est et sur 15 km du nord au sud. La gamme d'altitude de présence du hêtre sur le mont Ventoux est de 750 à 1695 m. De 1000 à 1600 m environ, le hêtre co-domine actuellement avec le sapin (*Abies alba*), mais la composition de ces peuplements évolue rapidement, du fait en particulier d'une mortalité accrue du sapin observée depuis les dix dernières années, qui concerne surtout la partie basse du gradient (Cailleret & Davi 2010). Comme l'ensemble des écosystèmes méditerranéens, le Mont Ventoux a subi les effets de l'activité humaine intensive et notamment une surexploitation des forêts qui a conduit à une situation de quasi-disparition des forêts à la fin du XIX siècle. Le hêtre comme l'ensemble des espèces a subi une considérable régression de son aire due au pastoralisme, mais également à son exploitation comme bois de chauffe. Cependant, il apparaît à présent que des populations de hêtre de taille non négligeable ont subsisté, en particulier sur la face nord et ont pu coloniser à nouveau le massif dès l'abandon des activités humaines

(Lander *et al.* 2011). La recolonisation du Ventoux par le hêtre et les autres essences autochtones comme le sapin, s'est amorcée à la fin du XIX siècle. En effet, en parallèle de la déprise agricole, le programme de restauration des terrains de montagne a été lancé en 1861 dans le but de limiter l'érosion des sols à nu en procédant à des reboisements. Sur le Ventoux, du pin noir a été planté ce qui favorisé la recolonisation des espèces autochtones (hêtre, sapin, etc.) grâce à la reconstitution d'un sol et la création d'un couvert forestier propice à l'établissement des semis (Guende 1978).

2.2) Climat

Une analyse détaillée du climat sur le Mont Ventoux est présentée dans la thèse de Maxime Cailleret (2011) et nous ferons ici une présentation brève des points principaux de ses résultats. Globalement, concernant les précipitations, le Mont Ventoux subit à la fois des influences de type montagnard européen et des influences méditerranéennes qui conduisent à une forte variabilité intra-annuelle des précipitations observée avec une sécheresse estivale intense typique du climat méditerranéen, le maximum des précipitations se produisant en automne puis au printemps. Concernant l'évolution du climat le long du gradient altitudinal, on observe une diminution de la température avec l'augmentation de l'altitude de -0.70°C par 100m ($R^2=0.99$, altitude zéro= 16.13°C , $n=7$) pour l'année 2008 et de -0.74 par 100m ($R^2=1$, altitude zéro= 17.48°C , $n=7$) pour l'année 2009. On observe également une augmentation des précipitations avec l'altitude le long du gradient pour la période 2000-2005 (Figure 8). Enfin, on observe une évolution exponentielle du nombre de jours de gels tardifs moyennés sur les années 2007 et 2008 sur le gradient (Figure 8).

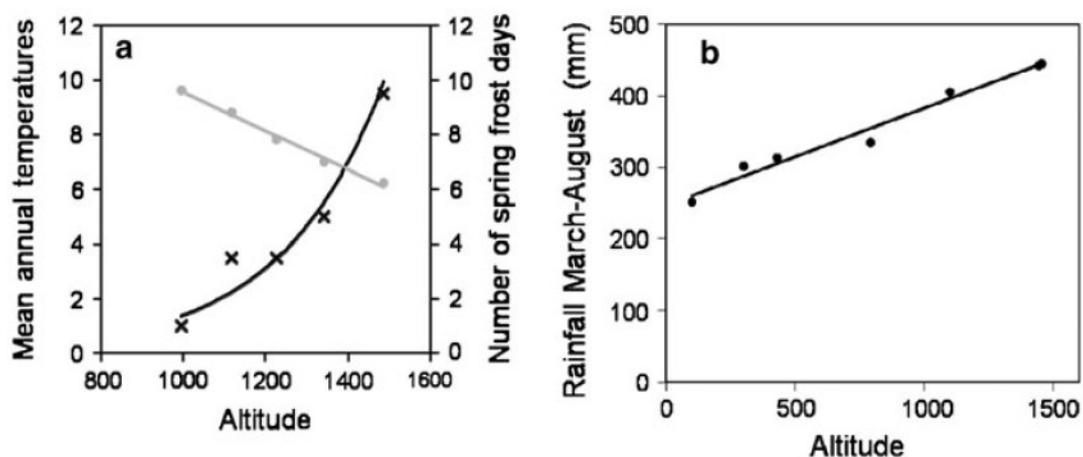


Figure 8 (Tirée de Cailleret & Davi 2010):

a) Effet altitudinal sur la température moyenne annuelle (cercles gris) et sur le nombre de jours de gels tardifs printaniers (croix noires, calculé comme la moyenne du nombre de jours de gel entre avril et juin) en 2007 et 2008 le long d'un gradient altitudinal du Mont Ventoux. **b)** Effet de l'altitude sur les précipitations printanières et estivales sur le Mont Ventoux pour la période 2000-2005.

2.3) Placette d'étude

La placette étudiée (placette N1) a une aire de 0.83 ha et comprend une gamme altitudinale allant de 987 m à 1048 m. Ainsi la placette étudiée se situe dans la partie basse de l'aire de répartition du hêtre sur le Mont Ventoux. La population de hêtre étudiée est située à une altitude telle qu'elle subit des influences de type méditerranéen significativement plus importante que le reste de la population de hêtre du Ventoux qui subit globalement une influence de type continental montagnard. La hauteur moyenne des hêtres qui est d'environ 12.5 m sur le site étudié est relativement faible (âge moyen ~ 80ans) considérant la taille moyenne de 30-35m habituellement observée pour d'autres populations au même âge. Sur le Mont Ventoux, le hêtre est souvent trouvé sous forme de cépaies à cause des rejets de souches. Sur la placette étudiée, environ 75% des individus poussent sous forme de cépaies, probablement à cause d'une forte exploitation passée pour le bois de chauffe.

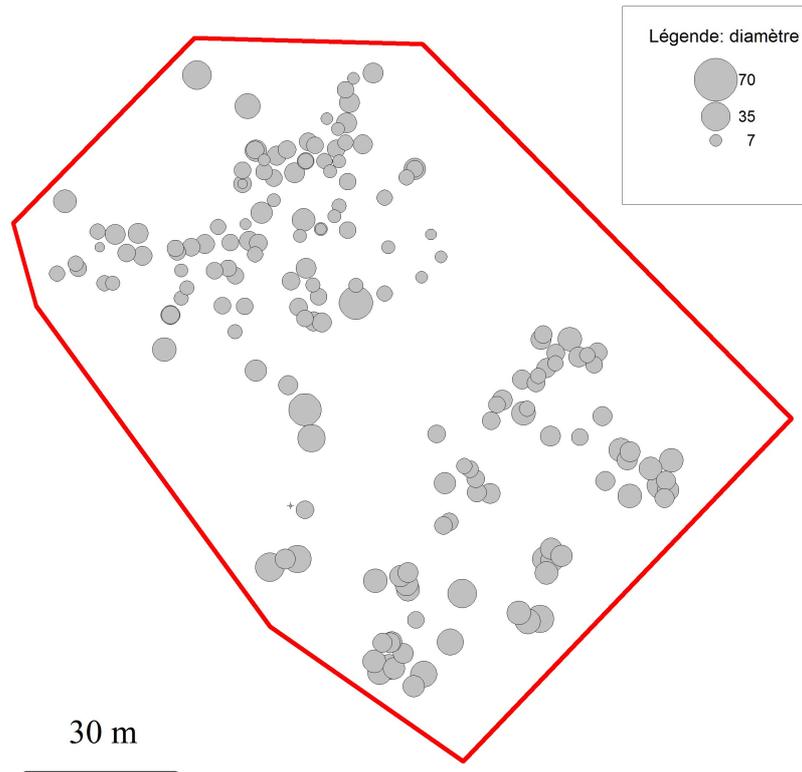


Figure 9 : Représentation du plan d'échantillonnage de la population adulte de hêtre étudiée dans la thèse. Les individus sont figurés par des ronds gris dont la taille dépend leur diamètre (cm). La délimitation de la placette est figurée par un trait rouge.

Chapitre 2.

Variabilité des traits fonctionnels foliaires et performance des individus

2) Variabilité des traits fonctionnels foliaires et performance des individus.

Synthèse de l'étude

1) Contexte et principe

L'impact des traits fonctionnels dans l'adaptation des individus à leur environnement et en particulier au climat qu'ils expérimentent est un sujet d'étude majeur en écologie. Par ailleurs, l'adaptation au climat implique l'action de plusieurs traits fonctionnels et une approche intégrée consiste à envisager le rôle coordonné de ces différents traits. En particulier, les traits fonctionnels foliaires ont tendance à présenter des relations relativement prédictibles, on parle de syndromes de traits. L'observation de ces syndromes a conduit à définir le concept de Worldwide Leaf Economic Spectrum qui relie les traits fonctionnels et leur syndromes aux différentes stratégies concernant l'« économie foliaire » (par exemple la durée de vie des feuilles permettant d'optimiser l'investissement des nutriments dans la croissance foliaire). Deux hypothèses principales expliquent la formation de ces syndromes : des contraintes structurelles et/ou génétiques, ou bien un échantillonnage de combinaisons génétiques particulières favorisées par la sélection naturelle. Dans le cas où les syndromes de traits sont sous sélection, cela signifie qu'ils peuvent également évoluer ; pour l'instant peu d'études se sont toutefois intéressées à la valeur adaptative de ces syndromes et il existe un besoin de fournir des preuves de l'influence mutuelle des traits dans la construction de la fitness.

Afin d'évaluer la valeur adaptative de la variabilité phénotypique observée des traits fonctionnels foliaires, plusieurs approches peuvent être mises en œuvre. Une approche classiquement utilisée (surtout chez les espèces herbacées) consiste à caractériser le lien entre la valeur des traits fonctionnels foliaires et les traits de performance des individus. Dans l'étude présentée dans ce chapitre, nous nous sommes placés dans le cadre méthodologique de la mesure de la sélection multivariée développée par Lande & Arnold (1983) pour estimer les gradients de sélection directionnels s'exerçant sur différents traits fonctionnels (sans les gradients quadratiques, voir équation 7 au chapitre IA). Afin d'évaluer si des combinaisons de traits étaient sous sélection, nous avons introduit un terme d'interaction entre les traits pris deux à deux afin de tester si l'action d'un trait donné était influencée par la valeur des autres traits.

Dans cette étude et dans la thèse en général, je me suis intéressée à différents traits fonctionnels foliaires connus comme étant impliqués dans l'adaptation au climat et en particulier aux contraintes hydriques : la masse surfacique foliaire (LMA) et ses composantes, la masse foliaire et la surface foliaire, le $\delta^{13}\text{C}$ foliaire utilisé comme indicateur de l'efficacité d'utilisation de l'eau, la quantité d'azote foliaire, la quantité d'eau foliaire et enfin la phénologie du débourrement. Ce dernier trait est a priori plutôt impliqué dans l'adaptation au climat en général, mais il a déjà été décrit comme participant aussi à l'adaptation des individus dans les milieux présentant des contraintes hydriques (Chuine & Beaubien 2001, Misson *et al.* 2011). Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence le lien entre la variabilité phénotypique et le niveau de compétition subi par les individus. Par ailleurs, nous avons caractérisé le lien entre les traits fonctionnels et les performances des individus (gradient de sélection directionnel). Ces performances ont été estimées à partir de plusieurs indicateurs complémentaires : la croissance radiale annuelle, la production de graine (quantité et qualité) ainsi que l'action coordonnée (terme d'interaction) de l'ensemble des traits étudiés sur la performance.

Ce chapitre se présente sous la forme d'un manuscrit en préparation, dont les principaux résultats sont résumés ci-dessous, avant une présentation détaillée des traits fonctionnels étudiés.

2) Résultats et discussion

En premier lieu, nous observons que la compétition influence significativement la variabilité de certains des traits fonctionnels foliaires étudiés, à savoir la phénologie du débourrement, la masse surfacique foliaire ainsi que ses composantes (masse et surface) et la quantité en eau foliaire. La croissance est également fortement affectée par la compétition comme l'indique la forte corrélation observée entre la croissance et le niveau de compétition. Concernant la phénologie du débourrement la masse surfacique foliaire, la masse foliaire et la quantité en eau foliaire, l'échelle à laquelle agit la compétition (~20m) indique une compétition pour les ressources du sol. Du fait des contraintes hydriques relativement fortes dans la population étudiée, et du rayon d'action de la compétition, on fait l'hypothèse que la compétition concerne avant tout les ressources en eau.

Par ailleurs, deux principaux syndromes de traits ont été indentifiés dans la population étudiée : syndrome n°1 = débourrement précoce, faible valeur de masse surfacique foliaire, forte quantité en eau foliaire et faible valeur de $\delta^{13}\text{C}$; syndrome n°2 = débourrement tardif, forte valeur de masse surfacique foliaire, faible quantité en eau foliaire et fortes valeurs de $\delta^{13}\text{C}$. Par ailleurs le $\delta^{13}\text{C}$ est associé positivement à la quantité d'azote foliaire. Connaissant la fonction de ces traits, nous interprétons le syndrome n°1 comme étant

« dispendieux en eau » (« water demanding ») et le syndrome n°2 comme étant « économe en eau » (« water saving»). Il est intéressant de voir que la part de la masse surfacique impliquée dans ce syndrome est indépendante de ses composantes, alors que par ailleurs, la masse surfacique co-varie fortement avec ses composantes (masse surfacique forte, forte surface et forte masse).

Par ailleurs nous avons mis en évidence des liens complexes entre les traits fonctionnels foliaires et les traits de performance, comprenant à la fois des estimations significatives de gradients de sélection et des termes d'interaction. Concernant la croissance, on détecte des effets marginalement significatifs des traits morphologiques : masse surfacique foliaire, surface foliaire et masse foliaire. Ainsi, une faible masse surfacique foliaire, une faible surface foliaire et une forte masse foliaire sont associées à une forte croissance. Pour certaines années, la phénologie semble avoir un effet positif, mais cet effet est trop léger pour être détecté sur la performance moyenne. Par ailleurs contrairement à la croissance on observe des effets principaux de la phénologie du débourrement et des traits physiologiques sur la production de graine ; l'effet des traits morphologiques est l'inverse de celui observé sur la croissance. Enfin, nous observons de nombreuses interactions significatives, en particulier en ce qui concerne la croissance. Ainsi, dans l'hypothèse que l'ensemble des traits mesurés sont impliqués dans la construction de la fitness, ce processus de construction, comme attendu, se révèle complexe avec des effets différents des traits selon la composante (croissance/reproduction). Un résultat majeur de cette étude est l'observation d'effets d'interaction significatifs entre traits fonctionnels foliaires sur les performances des individus. Cela confirme la nécessité de mener des études de micro-évolution afin de mieux comprendre la formation des syndromes de traits dans les populations naturelles comme ceux qui sont présentés dans le concept du worldwide leaf economic spectrum.

3) Les traits fonctionnels étudiés

Dans cette section, nous présenterons plus en détail les traits fonctionnels foliaires étudiés et les raisons pour lesquelles nous avons choisi de les inclure dans une étude de l'adaptation en environnement contraint par la sécheresse. En particulier nous ferons une description rapide de leur rôle supposé dans la construction de la fitness et des questions qui se posent quant à leur impact sur la fitness en fonction des variables climatiques et en particulier des contraintes en termes de sécheresse. Enfin, en introduction du chapitre qui va suivre, nous présenterons des résultats concernant la variation de ces traits le long du gradient altitudinal du Ventoux.

3.1) Phénologie du débourrement

La phénologie est définie comme l'étude de la répartition dans le temps des événements biologiques cycliques de la flore et de la faune qui sont influencés par l'environnement, en particulier par des variations de température conditionnées par le type de climat (Schwartz 2003). La phénologie du débourrement traite en particulier de la date de mise en place des feuilles, trait qui influence donc la durée de la saison de végétation et par conséquent le bilan de carbone annuel (Davi *et al.* 2006), son effet sur la performance des individus étant incertaine (Korner & Basler 2010). En effet, la valeur adaptative de la date de débourrement est liée à la coordination de la saison de végétation avec les aléas environnementaux (Chuine & Beaubien 2001). Les individus qui présentent une mauvaise coordination seront a priori contre sélectionnés du fait d'une fitness réduite résultant d'une diminution du bilan de carbone annuel. Par exemple, l'occurrence de gels tardifs est souvent avancé comme un facteur de contre sélection des individus précoces du fait de son effet destructeur sur les jeunes bourgeons et de l'impact négatif sur la capacité photosynthétique qui en résulte (Lechowicz 1984). Ainsi, on attend une optimisation dans les populations de la date de débourrement en fonction des impacts positif et/ou négatifs sur la fitness. De nombreux indices attestent de la forte valeur adaptative de ce trait et notamment la différenciation génétique habituellement observée en jardin commun est probablement due à une forte sélection (Savolainen *et al.* 2007).

3.2) Traits physiologiques foliaires

Dans cette thèse, deux traits sont étudiés : le $\delta^{13}\text{C}$ comme indicateur de l'efficacité d'utilisation de l'eau et la quantité d'azote foliaire exprimé par unité de masse. Plus particulièrement, l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque (W_i), c'est-à-dire l'efficacité d'utilisation de l'eau définie comme étant le ratio de l'assimilation nette de CO_2 (A) et la conductance stomatique (g_s) sera le paramètre d'intérêt dans cette thèse. L'efficacité d'utilisation de l'eau est un trait qui est suspecté comme étant impliqué dans l'adaptation au stress hydrique du fait de son lien direct avec la capacité des plantes à gérer l'eau disponible pour éviter les dysfonctionnements hydriques (Bréda *et al.* 2006, Meinzer *et al.* 2009, Hoffman *et al.* 2011). Ainsi, c'est un trait qui est a priori sous forte sélection et dont on suspecte qu'une part de la variabilité est contrôlée par la disponibilité en eau.

Brièvement, le calcul du $\delta^{13}\text{C}$ consiste à calculer la discrimination isotopique faite par la plante qui fixe préférentiellement le carbone 12 par rapport au carbone 13. Plus la plante a un W_i fort moins elle discrimine le carbone 13. Ainsi plus la plante est efficace, moins la différence entre la composition

isotopique de l'air et la composition isotopique du carbone assimilé est fort. Le $\delta^{13}\text{C}$ est lié à l'efficacité d'utilisation de l'eau par les relations suivantes (Farquhar *et al.* 1989, Roussel *et al.* 2009) :

$$\Delta^{13}\text{C}_{ech} \approx \delta^{13}\text{C}_{air} - \delta^{13}\text{C}_{ech} \quad \text{Équation 9}$$

Avec, $\delta^{13}\text{C}_{air}$ le rapport isotopique du carbone atmosphérique et $\delta^{13}\text{C}_{ech}$ le rapport isotopique du carbone de l'échantillon considéré

$$\text{et} \quad \Delta^{13}\text{C}_{ech} = b - (b - a) \frac{1.6W_i}{c_a} \quad \text{Équation 10}$$

Avec a un coefficient de discrimination du CO_2 durant la diffusion à travers les stomates, b un coefficient de discrimination du CO_2 durant le processus de carboxylation et c_a la fraction molaire de carbone dans l'atmosphère.

Dans cette thèse, nous faisons une hypothèse majeure qui est que le $\delta^{13}\text{C}_{ech}$ est assimilable au $\Delta^{13}\text{C}_{ech}$ car n'ayant pas accès au $\delta^{13}\text{C}_{air}$ pour chaque individu. Une autre hypothèse importante est que l'on considère que les variations éventuelles des coefficients a et b entre individus sont négligeables ce qui nous permet de considérer le $\delta^{13}\text{C}_{ech}$ comme un proxy du W_i . C'est donc un trait a priori très intégrateur du fonctionnement de la plante en relation avec la disponibilité en eau. Cependant l'origine de sa variabilité est difficile à déterminer puisqu'il varie conjointement avec les variations de transpiration et d'assimilation de carbone (Dawson *et al.* 2002, Roussel *et al.* 2009). Bien que nous n'ayons pas utilisé cette technique, des études utilisent à présent un autre indicateur isotopique qui est le $\delta^{18}\text{O}$ et qui est lié à la transpiration uniquement et donne donc des indications sur l'origine des variations de $\delta^{13}\text{C}$ (Dawson *et al.* 2002, Voltas *et al.* 2008). Par ailleurs, le $\delta^{13}\text{C}$ mesuré sur les feuilles intègre les variations d'efficacité durant la vie de la feuille voire au-delà (Dawson *et al.* 2002, Damesin *et al.* 1998). Ainsi, une valeur de $\delta^{13}\text{C}$ peut regrouper différentes stratégies de fonctionnement et en particulier la phénologie du fonctionnement de la plante est difficilement prise en compte.

Concernant les études de génétique un résultat intéressant souvent retrouvé est que le rang des génotypes est relativement constant entre différents milieux, ce qui accroît les chances de détecter une héritabilité significative (Dawson 2002). Une forte différenciation entre populations pour le $\delta^{13}\text{C}$ est souvent observée ce qui tend à soutenir l'hypothèse d'une forte valeur adaptative de l'efficacité d'utilisation de l'eau. Cependant, il n'est pas toujours évident de mettre en évidence sa valeur adaptative, à cause des raisons déjà énoncées, mais aussi car son impact dépend probablement des conditions environnementales.

Concernant la quantité d'azote foliaire, son effet sur la fitness est double. D'une part, il s'agit d'une ressource utilisée pour le fonctionnement de la plante. D'autre part, du fait de son lien avec la quantité de RubisCO (l'enzyme clé de la photosynthèse, qui représente 20 à 30% de l'azote foliaire chez les plantes en C3), la quantité d'azote foliaire est aussi corrélée avec les capacités photosynthétiques de la plante (Wright *et al.* 2002). Ainsi, on fait souvent l'hypothèse que les différences de concentration d'azote sont liées à des différences de capacités photosynthétiques (Wright *et al.* 2002, Donovan *et al.* 2009). Ce trait est donc étroitement lié à l'efficacité d'utilisation de l'eau via son rôle sur les capacités photosynthétiques. Cependant, du fait de la variation de l'efficacité à cause de la transpiration, le lien entre les deux traits n'est pas toujours évident (Donovan *et al.* 2009).

3.3) Traits morphologiques foliaires

Les traits étudiés dans cette thèse sont la masse surfacique foliaire (LMA pour Leaf Mass Area) et ses composantes, la surface foliaire et la masse foliaire. Généralement, aux milieux secs sont associées de fortes valeurs de LMA dans les populations (Wright *et al.* 2002, Bréda *et al.* 2006). Ainsi, l'augmentation du LMA y est souvent associée à une réduction de la taille et à un épaississement des feuilles, ce qui emmène à des capacités de photosynthèse réduites. Le LMA co-varie généralement avec la concentration en azote et la longévité des feuilles (fort LMA = forte longévité et faible concentration en azote), ces relations faisant partie d'un ensemble plus large de corrélations entre traits qui est dénommé le Worldwide Leaf Economic Spectrum (Wright *et al.* 2004). Les traits morphologiques sont généralement des traits très plastiques (Geber & Griffen 2003, Ramirez-Valiente *et al.* 2009), cependant des différences génétiques significatives entre populations d'origine adaptative liées aux conditions hydriques ont pu être observées (Ramirez-Valiente *et al.* 2009).

Effet de syndromes de traits fonctionnels foliaires sur la performance: indices de sélection corrélée dans une population de hêtre commun en milieu sec

Effect of leaf functional trait syndromes on performance: evidence of correlational selection in a dry population of European beech.

Aurore Bontemps, Hendrik Davi, François Lefèvre & Sylvie Oddou-Muratorio

Abstract

Understanding how naturally occurring leaf functional trait syndromes contribute the adaptation of plants to their environment is a central topic in ecology. However until now, few studies of contemporary evolution tested the adaptive value of these syndromes through the measure of correlational selection and they are usually interpreted as being the result of constraints of various kinds. The aim of this study was to characterise the selection applying on multiple leaf functional traits: leaf flush phenology, Leaf Mass per Area and its components (leaf area and leaf mass), leaf $\delta^{13}\text{C}$, leaf nitrogen content and leaf water content, and in particular to test whether they are under correlational selection. For that purpose, we characterised the effects of these functional traits on growth and reproductive output considered as proxies of fitness using multiple regressions in which interactions between functional traits were included in order to detect correlational selection. We showed that there is selection on leaf functional traits and moreover that the effect of each trait is highly conditioned by the value of the other traits demonstrating that correlational selection is at work in our population. Our findings support the recent calls for studies on contemporary evolution of leaf functional trait syndromes.

Introduction

The high variability of functional traits promotes plant adaptation to a wide range of climates. Functional traits influence the balance between resource acquisition and losses such as carbon balance, which is constrained by climate variables (Hoch & Körner 2009). When a plant is no longer able to modulate its physiology in response to climate variations and is getting away from resource balance optimization, it is predicted to have reduced fitness and in extreme situations to die (Bréda *et al.* 2006). Because adaptation to climate and more generally to most environmental variations relies on multiple functional traits, the coordinated response of functional traits gives rise to different syndromes of traits in different environments, resulting in phenotypic correlations among traits. Such syndromes have already been described in inter-specific studies at very large scales and, for example, gave rise to the concept of the Worldwide Leaf Economic Spectrum (WLES; Reich *et al.* 1999, Wright *et al.* 2004).

Phenotypic correlations can be split into environmental correlations and genetic correlations (Falconer 1941?). Disentangling the environmental and genetic basis of phenotypic correlations is a fundamental prerequisite to predict the evolutionary response of plant populations to changing environment. Environmental correlations relate to the co-variation of traits when a single genotype occurs in different environments each coordinating the plastic response of the observed traits. Genetic correlations can arise via two main mechanisms: first, via genetic constraints such as pleiotropic effects (McGuigan 2011) and second via linkage disequilibrium. Determining the origin of observed genetic correlations is important because different evolutionary trajectories are expected according to whether genetic correlations result from linkage disequilibrium or genetic constraints (Delph *et al.* 2011, Sivervo & Svensson 2002).

Most studies addressing the adaptive value of functional traits characterize their variations across large scale environmental gradients (Reich *et al.* 2003). These studies are particularly useful to identify relevant

traits involved in climate adaptations but they are not well suited to predict population adaptive dynamics. Indeed expected selection patterns derived from large scale inferences may differ from local selection (Arntz & Delph 2001, Reich *et al.* 2003). Because evolution takes place within populations, straightforward applications of large scale inferences may result in inaccurate predictions of population evolution and thus of species evolution. Ecophysiologicalists are aware of such problems as shown by the recent call for microevolutionary studies of functional traits (Arntz & Delph 2001, Reich *et al.* 2003, Donovan *et al.* 2011).

This is usually achieved by regressing fitness, measured through proxies (typically performance traits such as reproductive output; Dudley 1996), against functional trait values. These studies typically aim at predicting genetic changes in functional trait values under the hypothesis that the phenotype is heritable. When considering multi-trait evolutive response, the statistical framework developed by Lande & Arnold (1983) enables to account for the indirect effect of the phenotypic correlations between traits that are co-selected (multivariate selection). The multivariate model of Lande and Arnold enable to investigate the additive effect of traits on fitness considering thus that traits have independent effect on fitness. However, traits can interact together to determine fitness, this interdependence of selective values being termed correlational selection. Lande & Arnold (1983) have demonstrated that single trait evolution is correctly accounted for by the fitness function they proposed (that includes both directional + quadratic gradient) whatever the form of selection. However, correlational selection is important because it has been argued to create genetic correlations through linkage disequilibrium if traits under correlational selection have both a genetic basis, and in the long term to induce pleiotropic effects (Sinervo & Svensson 2002, McColl 2011). Correlational selection can be investigated by adding terms of interaction between functional traits in the Lande & Arnold model (Maad 2000). While many studies addressed independent selection gradients, little is known about correlational selection and in particular in ecophysiological traits (Dudley 1996, Donovan *et al.* 2011).

The aim of this study is to investigate how far selection on leaf functional trait combinations can contribute to rapid genetic evolution in tree populations facing water stress. Trees are characterised by a high level of genetic diversity and capacity of rapid evolution in response to local environmental conditions (Savolainen *et al.* 2007). However studying the effect of the selection due to water stress in trees poses several specific challenges. The first challenge is to target functional traits involved in the response to water stress. Water limitation induced by drought is expected to have cascading effects on tree functioning that may limit hydraulic dysfunctions and carbon shortages (Bréda *et al.* 2006). With water shortages, trees are subjected to hydraulic failure because of cavitation. One way to avoid cavitation is to adjust leaf morphological and physiological traits with the effect of reducing transpiration rates (Bréda *et al.* 2006, McDowell *et al.* 2008, Hoffman *et al.* 2011). The main counterpart of this strategy is that reduction in transpiration rates leads to reduction in carbon inputs. However some leaf morphological and physiological traits allow plant to limit such decrease: typically, in dry environments, high leaf mass per area (LMA) and high water use efficiency (WUE) are expected to be adaptive both by decreasing transpiration rates and by increasing the rate of carbon fixation per unit of water losses, in turn making these traits highly integrative (Roussel *et al.* 2009).

Besides the functional traits directly involved in water balance, other traits may be involved in response to water stress. In particular, phenology has been shown to be a major driver of trees distributions in relation to climate and consequently to altitude and should also be relevant in drought adaptations studies (Chuine & Beaubien 2001). Concerning the phenology of leaf flush, when summer drought occurs, we make the hypothesis that early flushers are better adapted, their vegetative cycle matching better the favourable growing season the benefit of “avoiding” the unfavourable season outperforming the eventual drawbacks (late frosts etc., Franks *et al.* 2007, Davi *et al.* 2006).

The second challenge is to account for the within-population environmental heterogeneity affecting the traits involved in water balance. Natural populations often experience strong micro-scale environmental heterogeneities such as variations of water resources in relation to edaphic conditions. Patches of different

environmental quality may contribute to different trait distributions due to the effect of the environment on trait expression, i.e. plasticity, and this may seriously complicate the identification of the causes of selection (Wade & Kalitz 1990). We assume that micro-scale variations in environmental quality is an important issue in our case, because we study the adaptive value of leaf functional traits that are expected to be involved in water economy and because the site is known to present strong micro-scale variations in water availability (Nourtier *et al.* in press).

The last challenge is to deal with the assessment of fitness, typically measured through three performance traits: vegetative biomass, reproductive output and survival (Violle *et al.* 2007). In trees, fitness is difficult to measure due to their long lifetime. A classic surrogate used to account for vegetative biomass is the annual radial increment with the underlying hypothesis that a high growth rate indicates an overall good tree performance. It has been often demonstrated the tight link between annual variations of radial increment and annual climate and it is actually the basis of dendroecology studies (Lebourgeois *et al.* 2005, Penuelas *et al.* 2008). Reproductive output is another proxy of tree performance. It is classically assessed with counts of the quantity of seeds produced by an individual. The effect of functional traits on seed production may vary considerably according to the annual climatic conditions, implying that a full characterization requires the sampling of many years or to use masting years because they are more representative of tree performance (Bell 2010). A last index of tree performance stands in the capacity of seed to germinate and give a new individual. The germination potentialities are tightly connected to seed mass (Tripathi & Khan 1990).

The objective of this study is to characterize the adaptive value of leaf functional traits in response to water stress in European beech (*Fagus sylvatica L.*). The originality of this study is that we characterise in >140 trees of a single population for various : leaf morphological traits (LMA and its component) as well as water

and nitrogen content and some indicators of water-use efficiency. Moreover, we investigated three kinds of approximation of tree fitness using information on radial increment, seed number and seed mass. The hypothesis tested here is that within the site there are successful functional trait syndromes conferring high fitness to dried environments. To test this hypothesis, we address the following issues: 1) is it possible to characterise functional trait syndromes based on phenotypic correlations? 2) Are functional traits correlated to fitness components, or in other words, are functional traits selected? 3) Does correlational selection operates in the studied population?

Material and method

Study site and species

The study site is located on the Mont Ventoux, 1909m in elevation (South-Eastern France, 44°10'28"N; 5°16'16"E). Common beech recently recolonized the slopes of the Mount Ventoux under the black pines (*Pinus nigra*) which were planted at the end of the 19th century as part of a massive national afforestation program. Common beech is a shade-tolerant species requiring high atmospheric humidity due to weak tolerance to summer drought. In the site, the main competitor is silver fir (*Abies alba*) but beech may suffer also the competition from older trees of other pioneer tree species ie: scots pine (*Pinus sylvestris*), Italian maple (*Acer opalus*), holly (*Ilex aquifolium*), downy oak (*Quercus pubescens*), common whitebeam (*Sorbus aria*) and black pines (*Pinus nigra*).

The study plot has an area of 0.83 ha and an elevation range of 987m to 1048m. As in Mont Ventoux, common beech ranges from 750m to 1695m in elevation, the studied plot is thus at the lowest altitude of beech range. The climate conditions are Mediterranean ie characterised by a hot dry summer and rainfalls mostly occurring in autumn. Temperature, relative humidity and rain events were recorded from 2007 to 2010. Temperature and relative humidity were recorded using a Prosensor V2 air temperature/relative humidity sensor (U23- 001 ± 0.2 ° C; ± 2.5% RH)

In Mont Ventoux, beech is often found in clusters of multiple stems due to root suckering or resprouting (favoured by coppice management). In the study plot ~75% of beech trees were found in such clusters, probably due to the former intensive exploitation of beech wood for firewood production.

Within the site, we exhaustively mapped 149 adult non-clonal individuals with diameter > 12cm. In case of cluster, only the biggest stem (generally dominant) of the cluster was sampled for trait measurement. Additionally we checked for the presence of clones among visually-defined clusters using genetic analysis (see Lander *et al.* 2011 for details) and kept only the biggest individual in case of clones. Spatial coordinates were measured using a Trimble GPS (precision < 1 m). Diameter at 1.3m above ground (dbh) was measured

for each of the 149 individuals and all the stems of the clusters. The competitive status was recorded following three classes: 1) Dominant; 2) Co-Dominant; 3) Supressed. Finally, we exhaustively mapped all the competitor individuals of the 149 beech individuals, and recorded their species and dbh.

Measurement of functional and performance traits

For the 149 beech trees we first measured the following functional traits (considered in the following to affect fitness) : leaf ecophysiological traits (leaf $\delta^{13}\text{C}$, leaf nitrogen content), leaf morphological traits (LMA, leaf area, leaf mass and leaf water content) and leaf flush dynamic. Both leaf ecophysiological and morphological traits were measured at the branch scale while leaf flush dynamic was measured at the tree scale.

Secondly we measured the following performance traits (considered in the following as components of fitness) : annual ring increment, total seed output and the mean seed weight. Measurements of mean seed weight were done at the branch scale, evaluations of total seed output were done at the tree scale and the annual ring increment measures the individual increase in trunk diameter and is a punctual measure (wood cores).

The number of individual successfully phenotyped for each trait appears in Table 1.

Leaf flush phenology records : We recorded in-situ leaf flush dynamics for 146 among the 149 beech trees in 2009. We decided not to record 3 trees because they were too highly dominated. We monitored the leaf unfolding stages twice a week. Five stages were distinguished (for more details see Davi *et al.* 2011) to accurately quantify leaf unfolding dynamics (in parentheses, we give the correspondence with the international BBCH code). 1: buds are dormant (0); 2: buds are swelling (1); 3: bud scales are broken (3); 4:

leaves are emerging (7); 5: leaves are spread out (9). The recording period lasted from the 23rd of March to the 4th of May. The scores (from 1 to 5) are summed at every date of measurement to calculate for each tree a PSS (Phenology Score Sum). The higher the PSS at a given date of measurement, the earlier and quicker is leaf unfolding.

Morphological and physiological traits: In the second week of July 2009, beech trees were climbed to collect light-exposed branches at the top of trees' crown. The branch part carrying the ten terminal leaves was cut. For each individual, three such branches were sampled at different positions in the crown and treated as replicates.

Global fresh mass and area of the ten terminal leaves were measured for each of the three replicates. Leaf area (LA) was measured using a leaf area meter (Delta-T Area meter, Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK). Leaves were oven-dried at 65°C during 48h and global dry mass was measured (LM). Leaf Water Content (LWC) was calculated as the ratio of fresh mass minus dry mass over fresh mass. LMA was calculated as the ratio of dry mass over area.

Among the three replicates per tree, the one having the highest LMA was selected for carbon isotope and nitrogen analysis. Carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) was measured using a continuous flow isotope mass spectrometer coupled to an elemental analyser (Roussel *et al.* 2009). The relative abundance of delta 13C was expressed as:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(R_s - R_b)}{R_b} \times 1000, \quad \text{Eq. 1}$$

where R_s and R_b refers to the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of the sample and in the Pee Dee Belemnite standard respectively.

Leaf nitrogen content defined as the quantity of nitrogen per unit of leaf mass (N_{mass}) was measured in parallel with $\delta^{13}\text{C}$.

Ring analysis : Trees were cored at breast height at the end of the winter of 2008-2009. For 98 individuals ring width was measured using X-ray film of the wood cores and WinDENDRO software (Guay *et al.* 1992) following the procedure described in Martinez-Meier *et al.* (2008). For the other 51 individuals, the wood cores X-ray film were blurred (due to tension wood) and impossible to analyse with WinDENDRO; however we could point the rings using scanned images and CDendro v5.3 software (CDendro 5.3 &CooRecorder 5.3; Larsson L.A. *et al.* 2006; Cybis Elektronik & Data AB. Sweden). These two methods provided ring width profiles of the last 50 years for each sampled tree. We checked for the presence of missing rings and typing errors by visually cross-dating the 50 year series with CDendro the individual ring width profiles with a reference chronology available from a previous study (Cailleret & Davi 2010). When uncertainties remained, profiles were discarded from analyses, resulting in a total of 138 individuals out of 149 for ring width analysis.

The variables used in the following statistical analysis were:

- mean ring width over the last ten years (period 1998-2008), noted as RW10M
- Ring widths of the last ten years, which represents ten variables, noted as RW+YEAR

Ring width is known to be strongly influenced by tree diameter due to geometric effects. Several statistical tools based on profiles detrending have been developed to remove this effect. Such detrending methods were initially designed for dendrochronology studies to remove low frequency signals (age effect, long term climate change) and medium frequency signals (thinning) in order to extract the year-to-year ring width changes related to yearly climate variations. Here, we are interested by recent ring width variation among individuals and the main problem was to distinguish the respective effect of diameter and functional traits on ring width. To that purpose, we fitted multivariate linear models including tree diameter as a covariate (section “Statistical analysis”, paragraph c). The linear effect of diameter was thus removed taking into account the covariance of diameter with functional traits.

Seed production: Seed production was characterized by total seed output (S_{tot}) and mean seed weight (SW_{mean}). Total seed output was directly estimated in the field at the end of the summer 2009 (masting year) by estimating the percentage of the crown covered by fruits shells. We defined five classes; class 1 : no fruits observed; class 2 : less than 25% of the crown covered by fruits; class 3 : between 25% and a half of the crown covered ; class 4 : between a half and 75 % of the crown covered ; class 5 : more than 75 % of the crown covered. The mean seed weight was assessed on the same branches collected for leaf analysis (described in section “Morphological and physiological measures”).

Statistical analysis

a) Effect of competition on functional traits: We selected two competition indices that account simultaneously for the diameter and the distance of each competitor j to the competed individual i , the Hegyi index (Hegyi 1974) and the Martin-Ek index (Martin & Ek 1984):

$$Heygi_i = \frac{1}{dbh_i} \sum_{j=1}^{n_i} \frac{dbh_j}{d_{ij} + 1}, \quad \text{Eq. 2}$$

$$Martin - Ek_i = \frac{1}{dbh_i} \sum_{j=1}^{n_i} dbh_j \exp \left[\frac{-16 d_{ij}}{dbh_i + dbh_j} \right], \quad \text{Eq. 3}$$

where dbh_i and dbh_j are the diameter at breast height of the competed individual i and of competitor j , n_i the total number of competitors for individual i , and d_{ij} the distance between individuals i and j . We did not distinguish intra-specific and inter-specific competition, because the aim was to see whether overall competition that individuals suffer, affect their growth and their functional traits, and not to characterise the difference in intra-specific and inter-specific competition intensity.

In natural populations with non-random spatial distribution of trees, these indices, accounting for the spatial configuration of competitors, were shown to describe more accurately the competition than indices relying on diameter only (Stadt *et al.* 2007).

Because we did not know at which scale competition acts, we followed the following three-steps procedure to identify for each trait the distance interval ($0-d_{ij}max$) within which the competition effects were the strongest (Linares *et al.* 2009):

1. For all individuals, the two indices were computed for $d_{ij}max$ going from 1 to 50 m, with a step of 1m.
2. The vector of competition indices was correlated to each functional trait values and the resulting correlation coefficients were plotted against $d_{ij}max$.
3. The value of $d_{ij}max$ associated with the highest value of correlation was chosen to describe how competition affects the functional trait variations.

b) Phenotypic correlation among functional traits (functional traits syndromes)

To characterise functional trait syndrome, we performed a Principal Component Analysis (PCA) on the following variables : PSS, LMA, LA, LM, $\delta^{13}C$, N_{mass} and LWC. The analysis was performed with the function PCA of the R software package FactoMineR (Lê *et al.* 2008).

c) Quantitative relationship between functional and performance traits

To characterize the relationships between functional and performance traits, we performed multiple regression analysis of each performance trait against the set of functional traits. The main advantages of multivariate analysis as compared to univariate analysis is that the directional selection gradient of each functional trait is estimated without the potential confounding effects of phenotypic correlations among functional traits (Lande & Arnold 1983). For each performance trait P_i measured in individual i we considered the following model:

$$P_i = \alpha + \sum_j \beta_j X_{ij} + \sum_j \sum_k \rho_{jk} X_{ij} X_{ik} + \epsilon, \text{ Eq. 4}$$

Where α is the origin of the regression, β_j is the directional selection gradient on trait j , X_{ij} the phenotypic value of functional trait j in individual i , ρ_{jk} the interaction term, and X_{ik} the phenotypic value of functional trait k in individual i and ϵ the residual.

We first fitted complete models including all the functional traits: PSS, LMA, $\delta^{13}\text{C}$, LA, LM, N_{mass} , LWC and the circumference (Circ) as covariate and all the first-order interactions terms. The performance traits used were RW10M, RW+YEAR, S_{tot} , SW_{mean} . Variables were standardized based on their phenotypic standard deviation prior to analysis. LA, LM, Circ, RW10M, RW+YEAR were log-transformed to achieve normality requirements. Then, we selected the best model using a procedure of variable deletion-addition (stepwise regression). Models were compared based on their AIC. The procedure was conducted using the “step” function of the R software.

Results

Effect of competition on functional traits

The Hegyi index and the Martin-Ek competition indices behave similarly for all studied traits (Figure 1). Phenology of leaf flush of year 2009 (as measured by PSS) was affected by competition. Competition and PSS were negatively correlated meaning that in 2009, the stronger was the competition, the later it flushed: moreover the competition effect were the strongest at a long distance (until 27m, where the correlation coefficient between PSS and competition indices stabilized).

Leaf mass area (LMA) was highly sensitive to competition ($p_{\text{val}}(\text{cor}_{21}) \ll \ll 0.001$) at a long distance (until 21m). LMA and competition were positively correlated meaning that when competition increased, LMA increased too. The components of LMA varied also significantly with competition: both leaf area (LA; $\text{cor}_4=0.28$, $p_{\text{val}}=0.0007$) and leaf dry mass (LM; $\text{cor}_{21}=0.36$, $p_{\text{val}} \ll \ll 0.001$) increased with competition.

Leaf water content (LWC) was sensitive to competition particularly at short distance, and LWC was decreased when competition was strong ($\text{cor}_{23} = -0.25$, $p_{\text{val}} \ll \ll 0.001$). By contrast $\delta^{13}\text{C}$ was not affected by competition at any interval of distance. Nitrogen content (N_{mass}) appeared to be slightly affected at very short distances ($\text{cor}_2=0.17$, $p_{\text{val}}=0.04$).

Phenotypic correlations among functional traits

The two first axes of the Principal Component Analyses explained 54.7% of the total variance: 33.9% for the first axis and 20.8% for the second. Two groups of variables could be distinguished (Figure 2a): In the first group, PSS and LWC were negatively correlated with LMA and to a lesser extent to leaf $\delta^{13}\text{C}$ ie : the earlier individuals (with the highest PSS) also had high Leaf Water Content and low LMA and followed a tendency of low values of leaf $\delta^{13}\text{C}$. In the second group, high LM was associated to high LA. The third axis explained 16.9% of the variation and showed that $\delta^{13}\text{C}$ co-varied with nitrogen content (N_{mass}), with high $\delta^{13}\text{C}$

associated to high N_{mass} . Moreover LMA co-varied with its components LA and LM, which remained highly correlated.

Impact of functional trait on performance traits

Correlations between performance traits: First, in agreement with the expected geometric effect of circumference, we found a significant relationship between circumference and ring width ($RW_{10M}=f(\text{Circ})$: 0.60 ± 0.08 , $p_{\text{val}} < 0.001$; Table 2). We also confirm here the existence of a relationship between tree diameter and seed output ($\text{Stot}=f(\text{Circ})$: 0.25 ± 0.08 , $p_{\text{val}} < 0.01$, Table 2) meaning that any effect of functional traits on growth will indirectly affect seed production.

Principal effects of functional traits: Regarding the principal effects, all functional traits excepted leaf water content had an effect on at least one performance trait (Table 2 and 3). Leaf morphological traits (LMA, LM, LA) and leaf flush dynamic (PSS) contributed to all components of fitness, having an effect on both growth and reproduction while N_{mass} was found to only be related to reproduction.

Regarding growth performance, we investigated the effect of functional traits (measured in 2009) on annual (Table 4) and mean (Table 3) radial growth for the period 1998-2008. We found consistent and significant effects of LMA (8 years), LM and LA (both 7 years). While the effect of LA was always negative and the effect of LM always positive (suggesting a positive effect of LMA), a negative effect of LMA on annual radial growth was observed. Moreover, despite the strong effect on annual radial growth, LMA and LM had only a marginal effect on mean radial growth while LA had no significant effect (Table 2).

There was also a significant effect of PSS and $\delta^{13}\text{C}$ but only for one and two years respectively (Table 3). PSS had also a marginally significant effect in 4 other years. When significant, the effect of PSS was positive and

the effect of $\delta^{13}\text{C}$ was negative (Table 3). Finally there is no significant effect of these two functional traits on mean radial growth (Table 2).

Regarding reproduction, among the leaf morphological traits only LM had an effect on S_{tot} while all traits significantly affected SW_{mean} (Table 2). The sign of their effects was moreover exactly the opposite of those found for growth. PSS had a strong positive effect on S_{tot} but not on SW_{mean} . $\delta^{13}\text{C}$ was found to have a negative effect on SW_{mean} . Finally N_{mass} that was not involved in growth determinism was highly involved in reproduction with a positive effect on S_{tot} and a negative effect on SW_{mean} .

Interaction effects among functional traits : We found numerous significant interaction effects involving all performance traits (Table 2 and 3). First interactions occurred mainly between leaf morphological traits and the other traits ie PSS, $\delta^{13}\text{C}$, N_{mass} and for annual ring increment with LWC. Moreover, when a trait was involved in interactions with other traits, it was often with the three morphological traits together. The sign of the interactions involving both LM and LA were always of opposite signs. While few interaction terms were significant for annual ring increment, a high number of interactions was significant for the mean radial growth (RW10M), with significant interactions of leaf morphological traits with PSS, $\delta^{13}\text{C}$ and N_{mass} . We also found fewer interaction for reproduction traits. For growth, PSS, $\delta^{13}\text{C}$ and N_{mass} were found to be rather involved in interactions than to have directional selection gradients, modulating the effect of leaf morphological traits rather than directly impacting growth. For reproduction there were much fewer interactions, the directional selection gradient being stronger. We can notice that PSS as for growth do not impact directly SW_{mean} but interacts with leaf morphological traits. We finally found that circumference sometimes interacted with functional traits to determine both growth and seed production and in particular with PSS.

Discussion

Variability of functional traits in relation to competition

We showed a significant effect of competition on the variability of functional traits, and characterised the spatial scale over which competition acts. The competition exerted by one individual translates into a decrease in the level of resources available for its neighbours. Thus environmental quality experienced by individuals degrades while competition operates and the level of degradation is probably a function of the level of competition. This is corroborated by the negative effect of neighbours found on individual diameter. The distance within which the competition was found to act (~20m) indicates that competition mediates functional trait variability probably by acting on the level of water resources. Indeed, competition for light would have produced a maximal correlation between functional traits and the competition indices occurring at a shorter distance (<10m).

The studied population is located in the lowest part of its altitudinal range in Mont Ventoux where climatic conditions are the among hottest and the driest of its range and water may thus represent a limiting resource. Moreover strong micro-scale environmental heterogeneity in water availability were previously observed on Mont Ventoux (Nourtier *et al.*, in press). This supports the hypothesis of trait variation driven by competition for water resources. However, to ensure it, it would be worth to observe directly both the influence of competition on the level of available water and the effect of water on trait variations as well.

Functional trait syndromes : coordinated environmental responses

We characterized patterns of phenotypic correlation among functional traits in the studied population, and could distinguish basically two syndromes based on the first axis of the PCA. Moreover, as detailed in the last section, we have characterised the variation of functional trait in relation to the level of competition. We will here assume that competition is a good proxy of environmental quality and more generally that its effect mimics those of the overall environment variations. Thus we will formulate some hypothesis of

expected environmental correlations based on competition analysis (Table 4) and use these inferences in order to interpret observed links between traits. Thus, putting in relation the observed phenotypic correlations and result of the competition analyses, we can propose the following interpretation of the syndrome of functional traits observed in the studied beech population: weak competition favoured a water-demanding syndrome grouping low LMA, low leaf $\delta^{13}\text{C}$, early leaf unfolding and high leaf water content; alternatively, strong competition favoured a water-saving syndrome grouping high LMA, high leaf $\delta^{13}\text{C}$, late leaf unfolding and low leaf water content. Note that because the competition analyses account only for the plastic response of the traits, such interpretation corresponds to the expected correlations that we should observe if functional traits would possess only an environmental basis.

The grouping of LMA, leaf unfolding and leaf water content are fully consistent among the PCA and the competition analysis and thus the observed patterns of phenotypic correlations are those expected under the effect of environment. This does not necessarily mean that genetic correlations do not contribute to the observed phenotypic patterns, but either they act in the same sense than phenotypic correlations or at least they only have a limited impact.

The relationship between leaf $\delta^{13}\text{C}$ and syndromes related to water economy is consistent with its supposed function but not with competition results (Table 4). We have to keep in mind that leaf $\delta^{13}\text{C}$ depends on organic matter produced during their formation in spring or comes from carbohydrate reserves formed the previous years. Consequently, $\delta^{13}\text{C}$ is more a proxy of drought effect of previous years mixed with the climatic conditions during leaf expansion and maturation (from April to May), than a real index of water use efficiency of the current year. Another possibility is that environment is not the only driver of the correlations and that there should be a genetic basis due to genetic constraints or to correlational selection. However this needs further investigations such as the measure of genetic correlations or the characterisation of other environmental variables that competition study may have not captured such as light availability. Finally, we do not recover the classical association between N_{mass} and LMA that is part of well known WLES (Wright *et al.* 2004) when compared several species, N_{mass} having an independent behaviour.

N_{mass} is positively linked to $\delta^{13}\text{C}$ which is in agreement with an effect of nitrogen content on $\delta^{13}\text{C}$. In our population, the effect is positive probably because of increase assimilation rates with increase in N_{mass} , however opposite patterns have also been reported because of an impact of N_{mass} on transpiration rates.

Evidence of directional selection on leaf functional traits

Assuming that all studied performance traits contribute to fitness, we found that all functional traits were involved at some steps in fitness determinism. Using the classical quantitative genetic framework (Lande et Arnold 1983) extended to the characterisation of interactive effects of multiple traits on fitness (Dudley 1996, Maad 2000) we characterised both directional selection gradients and interaction terms (equation 4). In this section we will discuss directional selection gradients, which are useful to predict the direction of trait evolution.

In the classical evolutionary quantitative genetic framework, the estimated directional selection gradient of functional traits on performance traits quantifies the direct impact of functional traits on fitness. First of all, we found evidences that functional traits can respond to variation in competition level and thus to variation in environmental quality. When micro-scale environmental quality experienced by individuals (abiotic + biotic) is not known, measurement of the effect of traits on fitness may suffer of environmentally induced bias, and this may lead to erroneous conclusions of their adaptive value if the environment is not accounted. Testing the adaptive value of functional traits ideally requires to characterise any differences in environmental quality (Wade & Kalitz 1990) or to regress fitness on genetic values instead of phenotypic values (Rausher 1992). For example, the positive effect of phenology of leaf flush on reproduction could be due to the co-determinism of competition that when increasing would both delay the timing of leaf unfolding and decrease growth. However, in the following we will discuss the observed effect of trait in relation with what is already known about their role on plant functioning.

Despite a marginal effect found on mean radial growth, leaf morphological traits appear to have major impact on fitness, and contrasted effects on growth and reproductive components of fitness. The positive effect of LA on growth and the negative effect of LM agree with the expectation that small and thick leaves help to deal with lack of water. For reproduction this is no longer true, probably because large and thick leaves that fix more carbon per unit of time may have provided enough resources for the considerable needs of a mast production. The effect of leaf flush dynamics on growth and reproduction is consistent with the hypothesis that an early start of the phenological season influences positively total carbon fixation despite the various drawbacks such as late frosts or water depletion (Chaine & Beaubien 2001, Korner & Basler 2010). The influence of N_{mass} on S_{tot} typically could be observed because seed production is highly resource demanding ; an hypothesis would be that individuals that are more able to mobilize nitrogen also produce more seeds making thus N_{mass} an adaptive trait.

Functional traits syndromes : correlational selection

In the previous section, we have discussed about the selection on adaptive traits in our population by looking at their primary effect on both growth and reproduction. In this section, we will extend the discussion to correlational selection, ie the interactive effects of functional traits on fitness, in order to determine whether some combinations of traits are more adaptive than others as suggested by the consistent syndromes found by several studies (Wright *et al.* 2004, Donovan *et al.* 2011).

We found that all leaf functional traits interact together and in particular leaf morphological traits interact strongly with leaf physiological traits but also with leaf phenological traits. Moreover, despite the lack of directional selection gradients, physiological traits such as leaf $\delta^{13}\text{C}$ promote plant adaptation acting together with morphological traits.

The observation of numerous interactions between functional traits that determine the various fitness components suggests that correlational selection is the rule rather than the exception as it was predicted in

previous studies (Maad 2000, Donovan *et al.* 2011). This picture an integrated view of adaptation in which traits instead of acting independently as is usually considered in selection studies have interdependant functions. Thus phenotypic correlations between traits should not be seen only as confounding factors that bias inferences of selection but also as being the target of selection. These findings agree with the recent recommendations made by Donovan *et al.* (2011) that a full understanding of the formation of WLES should involve microevolutionary studies of correlational selection but this should be also true whenever more than one trait participate to adaptation.

Acknowledgements :

We would like to thank Oliver Brendel, Claude Brechet and the laboratory of “Ecologie et écophysologie forestière” of INRA Nancy, for the realisation of carbon isotopes and nitrogen analysis.

References

- Arntz A.M. and Delph L.F. (2001) Pattern and process: evidence for the evolution of photosynthetic traits in natural populations. *Oecologia*, 127, 455-467.
- Bréda N., Huc R., Granier A. and Dreyer E. (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals Of Forest Science*, 63, 625-644.
- Chuine I. and Beaubien E.G. (2001) Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecology Letters*, 4, 500-510.
- Davi H., Gillmann M., Ibanez T., Cailleret M., Bontemps A., Fady B. and Lefevre F. (2011) Diversity of leaf unfolding dynamics among tree species: New insights from a study along an altitudinal gradient. *Agricultural and Forest Meteorology*, 151, 1504-1513.
- Delph L.F., Steven J.C., Anderson I.A., Herlihy C.R. and Brodie Edmund D.I. (2011) Elimination of A Genetic Correlation Between the Sexes Via Artificial Correlational Selection. *Evolution*, 65, 2872-2880.
- Donovan L.A., Maherali H., Caruso C.M., Huber H. and de Kroon H. (2011) The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *Trends In Ecology and Evolution*, 26, 88-95.
- Dudley S.A. (1996) Differing selection on plant physiological traits in response to environmental water availability: A test of adaptive hypotheses. *Evolution*, 50, 92-102.
- Guay R., Gagnon R., Morin H. (1992) A new automatic and interactive tree ring measurement system based on a line scan camera, *For. Chron.*, 68, 138-141
- Hoch G. and Korner C. (2009) Growth and carbon relations of tree line forming conifers at constant vs. variable low temperatures. *Journal of Ecology*, 97, 57-66.
- Hoffmann W.A., Marchin R.M., Abit P. and Lau O.L. (2011) Hydraulic failure and tree dieback are associated with high wood density in a temperate forest under extreme drought. *Global Change Biology*, 17, 2731-2742.
- Kingsolver J.G., Hoekstra H.E., Hoekstra J.M., Berrigan D., Vignieri S.N., Hill C.E., Hoang A., Gibert P. and Beerli P. (2001) The strength of phenotypic selection in natural populations. *American Naturalist*, 157, 245-261.
- Lande R. and Arnold S.J. (1983) The Measurement Of Selection On Correlated Characters. *Evolution*, 37, 1210-1226.
- Le Roux X, Bariac T, Sinoquet H, Genty B, Piel C, Mariotti A, Girardin C, Richard P (2001) Spatial distribution of leaf water- use efficiency and carbon isotope discrimination within an isolated tree crown. *Plant Cell Environ*, 24, 1021-1032
- MacColl A.D.C. (2011) The ecological causes of evolution. *Trends In Ecology and Evolution*, 26, 514-522.
- McGuigan K., Rowe L. and Blows M.W. (2011) Pleiotropy, apparent stabilizing selection and uncovering fitness optima. *Trends In Ecology and Evolution*, 26, 22-29.

- Meinzer F.C., Johnson D.M., Lachenbruch B., McCulloh K.A. and Woodruff D.R. (2009) Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology*, 23, 922-930.
- Misson L., Degueldre D., Collin C., Rodriguez R., Rocheteau A., Ourcival J.M. and Rambal S. (2011) Phenological responses to extreme droughts in a Mediterranean forest. *Global Change Biology*, 17, 1036-1048.
- Reich P.B., Ellsworth D.S., Walters M.B., Vose J.M., Gresham C., Volin J.C. and Bowman W.D. (1999) Generality of leaf trait relationships: A test across six biomes. *Ecology*, 80, 1955-1969.
- Rauscher M.D. (1992) The measurement of selection on quantitative traits: biases due to environmental covariances between traits and fitness. *Evolution*, 46, 616-626.
- Reich P.B., Wright I.J., Cavender-Bares J., Craine J.M., Oleksyn J., Westoby M. and Walters M.B. (2003) The evolution of plant functional variation: Traits, spectra, and strategies. *International Journal of Plant Sciences*, 164, 143-164.
- Roussel M., Thiec D. I., Montpied P., Ningre N., Guehl J.M. and Brendel O. (2009) Diversity of water use efficiency among *Quercus robur* genotypes: contribution of related leaf traits. *Annals of Forest Science*, 66, 408p1-408p10.
- Savolainen O., Pyhajarvi T. and Knurr T. (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review Of Ecology Evolution And Systematics*, 38, 595-619.
- Sinervo B. and Svensson E. (2002) Correlational selection and the evolution of genomic architecture. *Heredity*, 89, 329-338.
- Tripathi, R.S. & Khan, M.C. (1990) Effects of seed weight and microsite characteristics on germination and seedling fitness in two species of *Quercus* in a subtropical wet hill forest. *Oikos*, 57, 289–296
- Violle C., Navas M.L., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I. and Garnier E. (2007) Let the concept of trait be functional! *Oikos*, 116, 882-892.
- Wade M.J. and Kalisz S. (1990) The Causes of Natural Selection. *Evolution*, 44, 1947-1955.

Figure 1: Correlation coefficients between competition and functional traits as function of the distance interval within which competitors were considered. Competition is measured by the Martin-Ek index (Black) or the Heygi index (Grey). See Table 1 for the abbreviation of the functional traits.

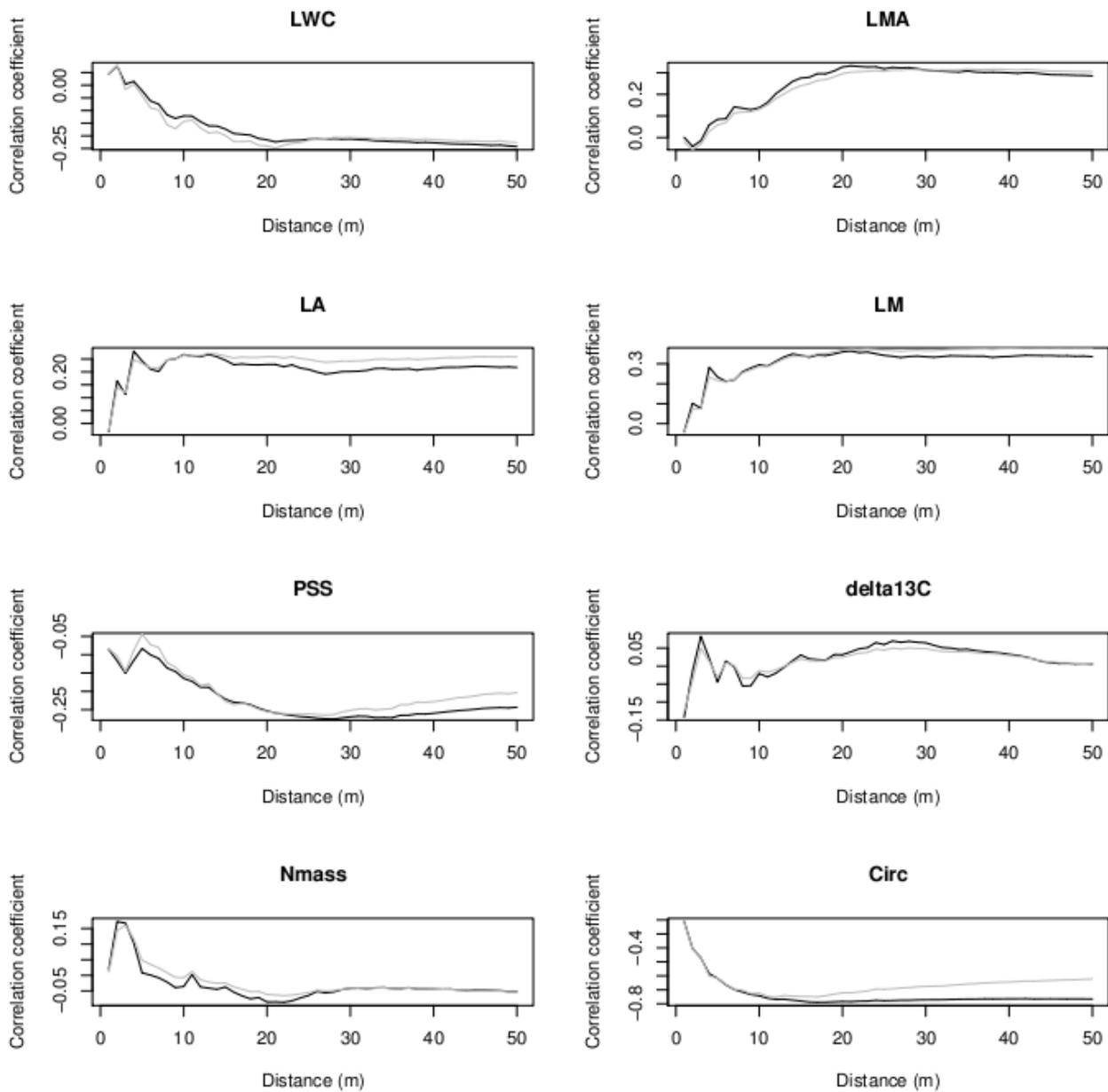


Figure 2: Graphical output of PCA analyses of functional traits PSS, $\delta^{13}\text{C}$, LMA, LA, LM, N_{mass} and LWC. The first and second principal components are represented. See Table 1 for the abbreviation of the functional traits.

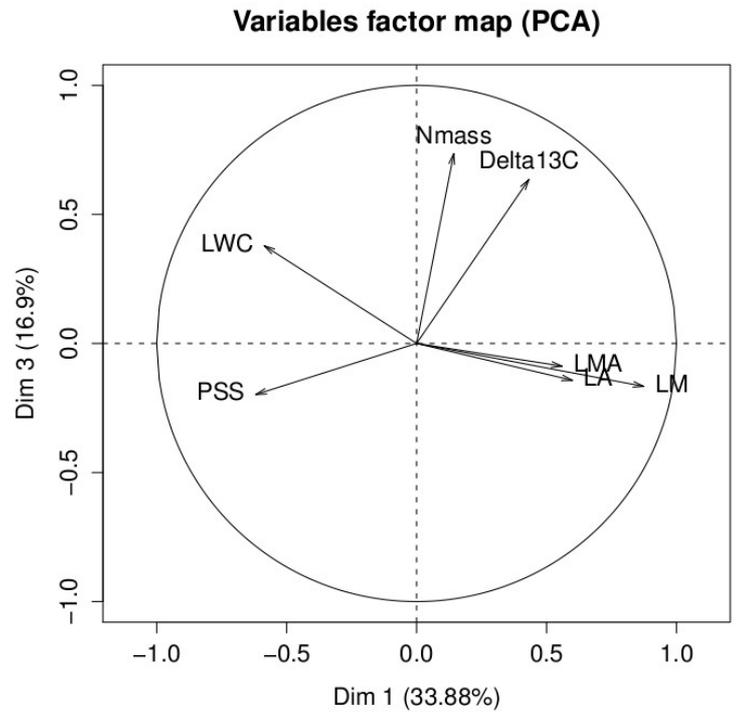
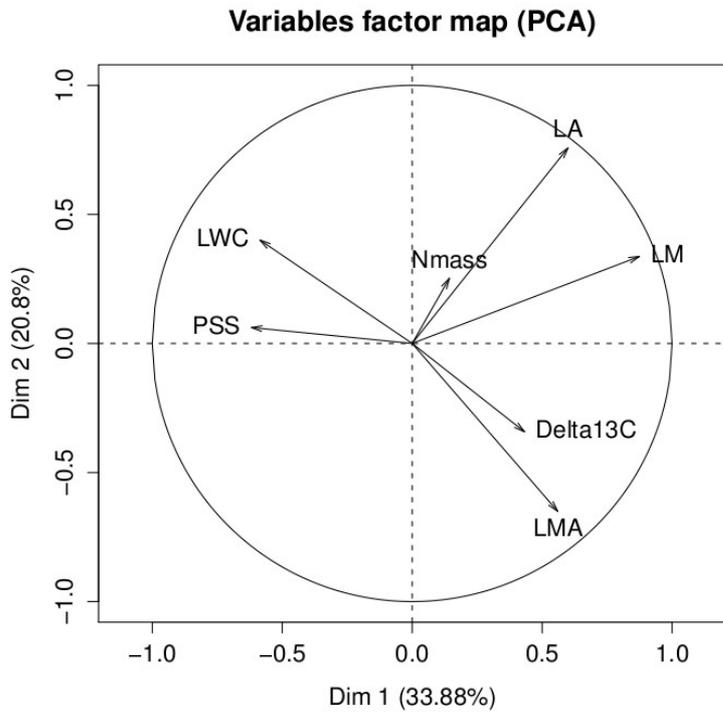


Table 1: Abbreviations, mean and standard deviation associated to each measured functional or performance traits. Circumference was computed from dbh and treated as a covariate.

Trait	Abbreviation	Category	N	Mean	SD
Leaf flush dynamic of the year 2009	PSS	Functional	146	46.93	5.27
Leaf mass per area (g.m ²)	LMA	Functional	149	97.71	14.69
Leaf area (cm ²)	LA	Functional	149	85.47	26.32
Leaf mass (g)	LM	Functional	149	0.85	0.27
Leaf $\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	Functional	149	-27.30	0.78
Nitrogen content	N _{mass}	Functional	149	2.23	0.27
Leaf water content	LWC	Functional	149	0.55	0.03
Circumference (cm)	Circ	Covariate	149	650.82	185.19
Mean ring width over the last ten years	RW10M	Performance	138	-	-
Ring width of the year YEAR	RW+YEAR	Performance	138	-	-
Total seed output	S _{tot}	Performance	149	-	-
Mean weight of a seed (g)	SW _{mean}	Performance	149	0.33	0.23

Table 2 : Multiple regression of growth (RW10M) and reproductive (S_{tot} SW_{mean}) performance traits against functional traits. First order coefficients (β_i) and second order coefficients (ρ_{ij}) of the multiple regression are reported, only for the variables that have a significant ($p_{val}<0.05$) and a marginal ($p_{val}<0.10$) effect.

		ρ_{ij}					
		β_i	$\delta^{13}C$	<i>PSS</i>	N_{mass}	<i>LMA</i>	<i>Circ</i>
RW10M	<i>LMA</i>	-0.86±0.47·	0.76±0.31*	0.17±0.09*	1.48±0.64*		
	<i>LM</i>	1.79±1.02·	-1.66±0.66*	-0.18±0.10·	-3.31±1.35*		
	<i>LA</i>	-1.55±0.93·	1.36±0.60*		3.04±1.22*		
	<i>Circ</i>	0.60±0.08***		-0.20±0.07*			
S_{tot}	<i>PSS</i>	0.21±0.08*					
	N_{mass}	0.24±0.07**					
	<i>LM</i>	-0.88±0.33**	0.13±0.08·				
	<i>LA</i>	0.61±0.31·				-0.15±0.07*	-0.17±0.06*
	<i>Circ</i>	0.25±0.08**		-0.16±0.07*			
SW_{mean}	<i>LMA</i>	1.80±0.82*		1.73±0.80*			
	<i>LM</i>	-4.53±1.74*	-3.75±2.03·	-4.46±1.69**			1.09±0.60·
	<i>LA</i>	4.23±1.62**	3.24±1.87·	4.12±1.56**			-1.08±0.60·
	$\delta^{13}C$	-0.48±0.22*					
	N_{mass}	-0.56±0.22*					

Significance levels are represented by the following symbols : $p_{val}<0.10$ (·) ; $p_{val}<0.05$ (*) ; $p_{val}<0.01$ (**) ; $p_{val}<0.001$ (***). See table 1 for trait names.

Table 3 : Multiple regression of yearly ring increment against functional traits. Directional selection gradients (β_i) and interaction terms (ρ_{ij}) are reported only for the significant effects ($p_{val}<0.05$) and marginally significant effects ($p_{val}<0.10$).

		β_i	ρ_{ij}				
			$\delta^{13}C$	<i>PSS</i>	N_{mass}	<i>WC</i>	<i>LA</i>
RW2008	<i>LMA</i>	-0.18±0.08*					
	<i>PSS</i>	0.15±0.08·			0.14±0.08·		
RW2007	<i>LMA</i>	-0.43±0.24·	0.26±0.15·				
	<i>PSS</i>	0.24±0.08**					
RW2006	<i>PSS</i>	0.14±0.08·					
	<i>LWC</i>	-0.05±0.08	0.14±0.08·				
RW2005	<i>LMA</i>	-1.37±0.47**	0.15±0.07*			-1.22±0.44**	
	<i>LM</i>	2.73±1.03**	-0.14±0.07*			2.24±0.90*	
	<i>LA</i>	-2.57±0.96**	0.23±0.09*			-2.18±0.84*	
	$\delta^{13}C$	-0.16±0.08*					
RW2004	<i>LMA</i>	-1.12±0.43*				-0.76±0.40·	
	<i>LM</i>	2.04±0.93*	-0.19±0.06**				
	<i>LA</i>	-1.91±0.89*		-0.16±0.09·			
	$\delta^{13}C$	-0.18±0.08*					
RW2003	<i>LMA</i>	-0.44±0.21*					
	<i>LM</i>	1.04±0.42*					
	<i>LA</i>	-0.91±0.39*		-0.31±0.14*			
RW2002	<i>LMA</i>	-1.20±0.49*				-0.87±0.48·	
	<i>LM</i>	2.52±1.05*				1.70±0.97·	
	<i>LA</i>	-2.34±1.01*		-0.18±0.10·	0.17±0.09·	-1.69±0.91·	
	<i>PSS</i>	0.17±0.09·					
RW2001	<i>LMA</i>	-1.67±0.59**			0.67±0.36·	-2.39±0.92*	
	<i>LM</i>	3.57±1.30**	-0.17±0.08*		-1.42±0.72·	5.04±2.01*	
	<i>LA</i>	-3.35±1.24**			1.44±0.70*	-4.80±1.90*	
	<i>WC</i>	0.26±0.12*					
RW2000	<i>LMA</i>	-1.20±0.49*				-0.87±0.48·	
	<i>LM</i>	2.52±1.06*				1.70±0.97·	
	<i>LA</i>	-2.34±1.01*		-0.18±0.10·	0.17±0.09·	-1.70±0.90·	
	<i>PSS</i>	0.17±0.10·					
RW1999	<i>PSS</i>	-0.14±0.08·					
RW1998	<i>LMA</i>	-1.13±0.48*				-0.81±0.46·	-0.16±0.07*
	<i>LM</i>	2.31±1.01*				1.57±0.92·	
	<i>LA</i>	-2.17±0.96*		-0.16±0.09·		-1.55±0.87·	

Table 4: Predicted phenotypic correlations due to competition

Weak Competition	Strong competition
Early PSS	Late PSS
Low LMA	High LMA
Low LA	High LA
Low LM	High LM
High LWC	Low LWC

Chapitre 3.

Héritabilité et corrélations génétiques de traits fonctionnels foliaires : Approches d'estimations in-situ

3) Héritabilité et corrélations génétiques de traits fonctionnels foliaires : Approches d'estimations in-situ.

Synthèse de l'étude

1) Contexte et objectif

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer la vitesse potentielle de l'évolution d'une espèce longévive, le hêtre commun, et plus particulièrement d'une population subissant des contraintes hydriques. Afin d'aborder cette question, nous avons dans ce chapitre caractérisé le potentiel évolutif (variabilité génétique, héritabilité, et corrélations génétiques) de traits fonctionnels foliaires connus pour être impliqués dans l'adaptation aux contraintes hydriques : phénologiques (phénologie du débourrement), morphologiques (masse, surface et la masse surfacique) et physiologiques ($\delta^{13}\text{C}$, quantité d'azote et quantité d'eau). En effet, pour une intensité de sélection donnée, la vitesse de l'évolution d'un trait entre chaque génération dépend de la base génétique de la valeur et des corrélations phénotypiques.

Pour le moment, le nombre d'études menées en milieu naturel reste faible comparativement aux études menées en milieu contrôlé, principalement à cause de difficultés méthodologiques. En effet, l'utilisation des méthodes classiques d'estimation des paramètres génétiques requiert de disposer du pédigrée de la population étudiée et son acquisition en population naturelle nécessite soit des observations directes, soit une reconstruction basée sur des analyses de parenté. Par ailleurs, le rôle des facteurs environnementaux étant difficilement rendus compte de façon réaliste en milieu contrôlé (cela n'étant pas le but principal de ces expériences), il existe à présent un besoin d'évaluer l'expression génétique et environnementale des traits en milieu naturel.

Nous avons mis en œuvre les approches d'estimations in-situ développée par Ritland (1996) [dénommée méthode de Ritland dans la suite] dont le principe est d'utiliser les relations d'apparentement estimées à partir de marqueurs moléculaires au lieu des pédigrées (voir encadré B pour la présentation des coefficients d'apparentement). Cette méthode est en effet particulièrement appropriée dans l'étude des traits phénotypiques au stade adulte chez les espèces à long temps de génération que sont les arbres, les pédigrées étant difficilement reconstituables du fait de l'accès à un nombre limité de générations. Cette méthode est souvent décrite comme peu puissante et fournissant des estimations biaisées de l'héritabilité.

Cependant, il semble que lorsque la population étudiée présente un fort niveau de structuration génétique spatiale, il est tout à fait possible de détecter de forts niveau d'héritabilité bien que biaisés.

À partir de 149 individus génotypés à 19 locus et un polymorphisme moyen de 8.42 allèles par locus, nous avons estimé l'héritabilité des traits fonctionnels foliaires phénologiques, morphologiques et physiologiques. Nous avons premièrement vérifié la capacité de notre jeu de donnée de fournir des estimations correctes et notamment si les propriétés en termes de structure génétique spatiale nous placent dans de bonnes conditions de détection des paramètres génétiques. Nous avons ensuite estimé les paramètres génétiques des traits fonctionnels foliaires étudiés, c'est-à-dire que nous avons estimé l'héritabilité et les corrélations génétiques. Dans nos analyses, nous avons pris en compte les effets éventuels du partage d'environnement commun entre apparentés qui peuvent conduire à une inflation de l'héritabilité. Ces analyses ont été menées pour différents niveaux moyens d'apparentement et pour cela nous avons procédé à une sélection des paires d'individus comparés sur le critère de la distance spatiale.

2) Résultats et discussion

Premièrement, l'intensité de la structure génétique spatiale est relativement élevée dans la population étudiée ($Sp = -0.026$) compte tenu des traits d'histoire de vie du hêtre (en moyenne $Sp = -0.013$ chez les allogames, $Sp = -0.006$ chez les anémophiles et $Sp = -0.010$ chez les arbres ; Vekemans & Hardy 2004). Cela est probablement dû à l'effet conjoint d'une dispersion du pollen et des graines restreinte (voir chapitre 4) et à l'histoire démographique de la population qui est en effet en pleine dynamique de recolonisation. En accord avec l'hypothèse d'une puissance de détection accrue de l'héritabilité avec la présence d'une structure génétique spatiale, nous obtenons des estimations d'héritabilité significatives pour plusieurs des traits fonctionnels foliaires étudiés à savoir la phénologie du débourrement pour les années 2009 ($=0.27$) et 2010 ($=0.16$), la masse ($=0.22$), le $\delta^{13}C$ ($=0.29$) et la quantité d'azote ($=0.53$). Nous avons par ailleurs obtenu des valeurs d'héritabilité non significatives pour la masse surfacique ($=0.02$), la surface ($=0.14$) et la quantité d'eau ($=-0.04$). D'après Coltman (2005), l'application de la méthode de Ritland en utilisant la correction pour la vraie variance d'apparentement calculée par le logiciel Spagedi fournit une sous-estimation des valeurs d'héritabilité quasi systématique. Par ailleurs, d'après la littérature (Gay *et al.* submitted), la méthode de Ritland est peu puissante pour détecter des héritabilités significatives. Une hypothèse raisonnable est donc que les valeurs que nous avons estimées comme étant significatives correspondent donc à de fortes valeurs d'héritabilité. Par ailleurs, les corrélations génétiques sont plutôt modérées voire basses, excepté la quantité d'azote qui co-varie négativement à la fois avec la masse et avec la surface foliaire.

Nos résultats sont en accord avec les résultats d'une méta-analyse effectuée par Geber & Griffen (2003) qui indique que les traits physiologiques sont plus hérissables que les traits morphologiques chez les plantes. Par ailleurs, les résultats que l'on obtient pour les traits physiologiques et morphologiques sont globalement cohérents avec de précédents résultats donnés dans Ramirez-Valiente *et al.* (2009) et qui concernent le chêne liège, le LMA étant très plastique ainsi que la taille des feuilles et le $\delta^{13}\text{C}$ ayant une forte variabilité intra-population. L'observation d'une forte variabilité génétique pour la phénologie du débourrement est cohérente avec les résultats obtenus pour le hêtre d'études comparatives menées en jardin commun (Vitasse *et al.* 2010). Il est également intéressant d'observer une forte hérissabilité pour le $\delta^{13}\text{C}$ malgré la forte plasticité attendue. Un résultat plutôt surprenant concerne la forte hérissabilité de l'azote. L'évolution des traits sera a priori peu affectée par les corrélations avec les autres traits, à l'exception des traits morphologiques et de la quantité d'azote qui pourraient s'influencer mutuellement. Globalement, la forte base génétique obtenue pour nos traits soutient la pertinence d'études de micro-évolution afin d'envisager le devenir des populations de hêtre dans le cadre de changements environnementaux.

3) Méthodes

3.1) Estimation classique des paramètres génétiques

Comme évoqué dans l'introduction générale, le modèle de la génétique quantitative permet de rendre compte de l'hérissabilité des caractères à variations continues, en proposant une interprétation de la variabilité phénotypique observée pour ces caractères. Une application de ce modèle est l'estimation des composantes génétique et environnementale de la variabilité, et de paramètres synthétiques (hérissabilité, évolvabilité.). Les allèles identiques et hérités d'un ancêtre commun sont dits identiques par descendance (IBD : identical by descent). La connaissance de la généalogie permet de prédire les probabilités que les allèles de deux individus soient IBD.

Le point délicat dans l'estimation de l'hérissabilité est l'estimation de la variabilité génétique (additive V_A et de dominance V_D), qui est la variance des valeurs génétiques ; Pour estimer les valeurs génétiques des individus, on utilise les phénotypes en faisant l'hypothèse que l'environnement est aléatoirement distribué entre apparentés, ce qui peut être considéré comme juste en environnement contrôlé. Considérons un cas simplifié où le caractère est déterminé par un gène (un exemple impliquant deux gènes est développé dans Lynch & Walsh 1998). Considérant deux individus diploïdes x et y ayant les valeurs génétiques G_x et G_y :

$$G_x = \alpha_1 + \alpha_2 + \beta_{12} \text{ et } G_y = \alpha_3 + \alpha_4 + \beta_{34}$$

Avec α_s les effets génétiques additifs et β_s les effets de dominance (Figure A.1). On obtient donc les covariances génétiques suivantes :

$$Cov(G_x, G_y) = Cov(\alpha_1 + \alpha_2 + \beta_{12}, \alpha_3 + \alpha_4 + \beta_{34})$$

Ce qui se développe :

$$\begin{aligned} Cov(G_x, G_y) = & Cov(\alpha_1, \alpha_3) + Cov(\alpha_1, \alpha_4) + Cov(\alpha_1, \beta_{34}) \\ & + Cov(\alpha_2, \alpha_3) + Cov(\alpha_2, \alpha_4) + Cov(\alpha_2, \beta_{34}) \\ & + Cov(\beta_{12}, \alpha_3) + Cov(\beta_{12}, \alpha_4) + Cov(\beta_{12}, \beta_{34}) \end{aligned}$$

Les effets additifs sont indépendants des effets de dominance (Lynch & Walsh 1998). Il ne reste donc que les termes de covariance entre les effets additifs et les effets de dominance. Les apparentés covarient du fait de partage d'allèles IBD. On montre que la covariance génétique des individus partageant un allèle IBD est égale à $V_A/2$.

Considérant la covariance génétique entre deux allèles x et y, on a donc (Lynch & Walsh 1998) :

$$Cov(\alpha_x, \alpha_y) = \begin{cases} 0 & \text{Si les allèles x et y ne sont pas IBD} \\ V_A/2 & \text{si les allèles x et y sont IBD} \end{cases}$$

Par exemple, la covariance génétique de demi-frères considérant qu'ils sont issus de la même mère se calcule comme suit :

- 1) En considérant que les pères ne sont pas apparentés, les deux demi-frères n'ont aucune chance de partager un allèle IBD par voie paternelle.
- 2) Ils ont une chance de partager un allèle par voie maternelle avec la probabilité $\frac{1}{2}$.

Étant donné qu'ils ne peuvent partager aucun allèle paternel en commun, les effets de dominance ne participent pas à la covariance génétique. On obtient donc une covariance génétique pour des demi-frères égale à :

$$Cov(G_x, G_y) = V_A/4 \quad \text{Équation 11}$$

Cette relation est couramment utilisée dans les dispositifs de milieux contrôlés dans lesquels sont semés des graines dont la mère est connue, ce qui amène à considérer les individus comme demi-frères s'ils ont la même mère, ou non apparentés s'ils ont des mères différentes.

L'équation 11 se généralise pour l'ensemble des relations d'apparentement comme suit :

$$Cov(G_x, G_y) = r_{xy} V_A + \Delta_{xy} V_D \quad \text{Équation 12,}$$

Avec r_{xy} , le coefficient d'apparentement, le coefficient de fraternité Δ_{xy} (encadré B), V_A la variance additive génétique et V_D la variance de dominance.

Dans le cas où les apparentés sont aléatoirement distribués dans l'environnement :

$$Cov(P_x, P_y) = r_{xy} V_A + \Delta_{xy} V_D + \epsilon_{xy} \quad \text{Équation 13,}$$

Avec P_x et P_y les phénotypes des individus x et y respectivement.

Cette relation générale permet aussi de traiter des pédigrées complexes tels que ceux que l'on trouve en population naturelle et constitue donc une base du développement des méthodes in-situ.

Encadré B : Coefficients de simple et de double apparentement.

Définition 1 : On dit que deux exemplaires d'un gène sont identiques par descendance (IBD) si ils sont la copie d'un même exemplaire ancestral de ce gène.

Remarque : deux individus peuvent partager le même allèle du fait de la généalogie, mais ils peuvent aussi être semblable par hasard du fait du nombre limité des allèles dans la population auquel cas les gènes seront dit identiques par état (IBS)

Définition 2 : Considérant les individus x et un individu y , le **coefficient de simple apparentement** (θ_{xy} , **kinship coefficient**) entre l'individu x et y est défini comme étant la probabilité qu'un exemplaire d'un gène tiré au hasard chez un individu x soit identique par descendance à un exemplaire du même gène tiré chez y .

Définition 3 : Considérant les individus x et un individu y , le **coefficient de double apparentement** (r_{xy} , **relationship coefficient**) entre l'individu x et y est défini comme la proportion d'allèles dans le génome de x et y qui sont identiques par descendance. Chez des individus diploïdes ne présentant pas de consanguinité, le coefficient de double apparentement est égal à deux fois le coefficient de simple apparentement.

Définition 4 : Considérant un individu x et un individu y , le **coefficient de fraternité** (Δ_{xy} , **fraternity coefficient**) entre l'individu x et y est défini comme la proportion des deux allèles présents à un locus dans le génome de x et y qui sont identiques par descendance.

3.2) *Estimations in-situ*

Comme en génétique quantitative classique, l'estimation des paramètres génétiques passe par l'association entre les traits phénotypiques des apparentés et leur niveau d'apparentement. Un des défis majeur des études in-situ tient dans l'élaboration de la généalogie ou pedigree, ce qui pour le moment constitue un frein majeur au développement des études in-situ. Une première solution consiste à observer directement les événements de reproduction dans le milieu naturel. Utilisée en particulier chez les oiseaux, Cette solution peut s'avérer coûteuse en temps et est sujette à erreur (paternité hors couple : 20% chez oiseaux) ; en outre chez les plantes, cette méthode est impossible à appliquer. Une deuxième solution consiste à reconstituer a posteriori les événements de reproduction, grâce aux méthodes de recherche de paternité/parenté utilisant les marqueurs moléculaires. Enfin, un modèle a été développé par Ritland (1996, 2000) qui permet de s'affranchir de l'utilisation de pedigree, les relations d'apparentement étant estimées à partir de marqueurs moléculaires. Il est à noter que la plupart des études de génétique quantitative menées en milieu naturel utilisent le modèle animal nécessitant d'avoir le pedigree de la population. Ce modèle est bien plus performant dans l'estimation des paramètres génétiques que la méthode de Ritland (Coltman 2005), mais il est inutilisable dans beaucoup d'études du fait de la difficulté de reconstituer les pedigrees.

Estimation de l'apparentement : Une autre méthode ou « méthode directe » consiste à reconstruire les pedigrees par assignations de parenté en utilisant les marqueurs moléculaires (Thomas et Hill 2000, Blouin 2003). En effet, la connaissance des liens de parenté entre les individus permet directement de prédire l'IBD et donc la proximité génétique. Une difficulté majeure de ces approches est l'accès aux génotypes des descendants et aux génotypes des parents voire des grand-parents (cousins), ce qui peut être très difficile en particulier pour les espèces à long cycle de vie. À l'opposé, les méthodes indirectes exploitent la proximité des génotypes observés pour la confronter aux IBD attendus en fonction du niveau d'apparentement (Weir *et al.* 2006).

Malgré la complexité des modèles probabilistes permettant de dériver les probabilités d'IBD à partir des pedigrees, des outils de calcul efficaces ont été élaborés (Jacquart 1968) et si les pedigrees sont fiables alors le calcul des probabilités d'IBD peut être considéré comme exact. L'estimation des probabilités d'IBD par l'approche fréquentiste est difficile à mettre en œuvre car les indices d'apparentement estimés peuvent varier fortement autour de la vraie valeur d'IBD Il y a plusieurs raisons à cela. Premièrement, deux individus pris au hasard dans une population peuvent partager des allèles à un locus donné :

1) du fait de leur apparentement, auquel cas les gènes sont IBD

2) par hasard du fait du nombre limité d'allèles même pour les marqueurs polymorphes, auquel cas les gènes seront IBS.

Pour parer à ce problème, les estimations ont été élaborées pour séparer les deux probabilités, la probabilité que les allèles soient IBS étant écrite en fonction de la fréquence des allèles dans la population. Une solution pour minimiser ce problème est de choisir des marqueurs avec un haut degré de polymorphisme comme les microsatellites.

Deuxièmement, à l'exception de la relation parent-enfant, l'apparentement réalisé peut être très variable entre locus. A priori, plus le nombre de locus utilisé pour estimer le coefficient d'apparentement est grand, plus on tend vers la vraie valeur d'apparentement. Ainsi, l'obtention d'une faible variabilité des estimations nécessite de génotyper les individus pour un grand nombre de locus, bien plus que ce qu'il est généralement possible d'avoir pour des espèces non modèles. Ainsi, Van De Casteele *et al.* (2001) ont analysé la proportion de la variation de l'apparentement estimé avec les marqueurs moléculaires due à la composition en apparentement des populations étudiées. Ils ont également étudié le lien entre cette proportion et trois paramètres : la qualité des données de microsatellite, la composition en apparentés de la population et l'indice utilisé. Les résultats sont synthétisés au tableau 1. Brièvement, on observe une proportion de la variance d'estimation expliquée allant de 25% à 79%. La proportion augmente avec un niveau élevé de l'apparentement moyen de la population. Enfin, la performance des indices diffère à la fois selon le niveau d'apparentement moyen de la population et selon la qualité du jeu de données microsatellites.

Population composition										
UR	0.25	0.25	0.25	0.20	0.20	0.20	0.40	0.50	0.60	0.60
HS	0.25	0.25	0.25	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
FS	0.00	0.50	0.25	0.60	0.00	0.30	0.20	0.20	0.20	0.00
PO	0.50	0.00	0.25	0.00	0.60	0.30	0.20	0.10	0.00	0.20

<i>r</i>	Variance explained									
a. Great tit data										
\hat{f}_{Swatol}	0.61	0.51	0.64	0.53	0.65	0.68	0.55	0.44	0.29	0.32
\hat{f}_{C0}	0.15	0.13	0.18	0.12	0.14	0.19	0.16	0.14	0.10	0.11
\hat{f}_{C1}	0.44	0.41	0.50	0.41	0.46	0.54	0.42	0.33	0.22	0.22
\hat{f}_R	0.50	0.43	0.54	0.43	0.50	0.56	0.50	0.42	0.31	0.34
$\hat{f}_{Qrst,rsi}$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
\hat{f}_{Qrst}	0.52	0.45	0.56	0.47	0.54	0.60	0.47	0.37	0.24	0.25
$\hat{f}_{Qswatol}^\ddagger$	0.52	0.42	0.55	0.42	0.55	0.59	0.46	0.36	0.23	0.26
$\hat{f}_{Qrst,avi}$	0.56	0.49	0.60	0.50	0.59	0.64	0.51	0.40	0.26	0.28
$\hat{f}_{Qswatol,rsi}^\ddagger$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\hat{f}_{Qswatol,avi}^\ddagger$	0.57	0.46	0.59	0.47	0.60	0.63	0.51	0.40	0.26	0.30
b. Barn swallow data										
\hat{f}_{Swatol}	0.75	0.56	0.71	0.56	0.79	0.74	0.66	0.56	0.40	0.49
\hat{f}_{C0}	0.49	0.40	0.52	0.38	0.48	0.53	0.48	0.42	0.31	0.36
\hat{f}_{C1}	0.42	0.37	0.47	0.37	0.44	0.51	0.39	0.30	0.19	0.21
\hat{f}_R	0.64	0.50	0.64	0.49	0.65	0.66	0.60	0.51	0.38	0.46
$\hat{f}_{Qrst,rsi}$	0.62	0.51	0.63	0.52	0.65	0.67	0.55	0.44	0.29	0.33
\hat{f}_{Qrst}	0.56	0.47	0.59	0.48	0.59	0.63	0.50	0.39	0.25	0.28
$\hat{f}_{Qswatol}$	0.73	0.56	0.70	0.55	0.75	0.73	0.65	0.55	0.40	0.48
$\hat{f}_{Qrst,avi}$	0.62	0.51	0.63	0.52	0.66	0.67	0.55	0.44	0.29	0.33
$\hat{f}_{Qswatol,rsi}^\ddagger$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\hat{f}_{Qswatol,avi}^\ddagger$	0.74	0.57	0.71	0.57	0.78	0.74	0.66	0.56	0.41	0.50
c. Kinkajou data										
\hat{f}_{Swatol}	0.43	0.37	0.48	0.39	0.47	0.53	0.38	0.27	0.16	0.17
\hat{f}_{C0}	0.31	0.30	0.38	0.29	0.31	0.39	0.34	0.28	0.20	0.20
\hat{f}_{C1}	0.25	0.21	0.29	0.22	0.26	0.32	0.22	0.16	0.09	0.10
\hat{f}_R	0.48	0.43	0.53	0.43	0.49	0.56	0.46	0.37	0.25	0.26
$\hat{f}_{Qrst,rsi}$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
\hat{f}_{Qrst}	0.35	0.30	0.40	0.31	0.38	0.44	0.31	0.22	0.13	0.14
$\hat{f}_{Qswatol}^\ddagger$	0.29	0.24	0.33	0.25	0.31	0.37	0.25	0.18	0.10	0.11
$\hat{f}_{Qrst,avi}$	0.43	0.36	0.47	0.38	0.46	0.52	0.38	0.27	0.16	0.18
$\hat{f}_{Qswatol,rsi}^\ddagger$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
$\hat{f}_{Qswatol,avi}^\ddagger$	0.35	0.30	0.40	0.31	0.38	0.44	0.31	0.22	0.13	0.14

†Information from six loci used: diallelic loci were disregarded. ‡Information from seven loci used: diallelic loci were disregarded.

Tableau 1 :

Proportion de la variance d'estimation de l'apparentement à partir de marqueurs microsatellites expliquée par le vrai apparentement. La composition des différentes population consiste en une variation de la proportion de non apparentés (UR), de demi-frères (HS), de pleins frères (FS) et de parents-enfants (PO). La proportion de variance expliquée consiste en une division de la variance du au vrai apparentement avec la variance totale des estimations.

Estimation des paramètres génétiques avec les approches in-situ : Dans cette thèse nous utiliserons le modèle d'estimation de l'héritabilité et des corrélations génétiques développé par Ritland (1996) qui utilise les estimations d'apparentement dérivées des marqueurs moléculaires, et c'est ce modèle que nous développerons dans ce paragraphe. Ces deux types de modèles reposent sur l'utilisation de l'équation 9 pour estimer les effets génétiques ce qui leur permet d'exploiter l'ensemble des relations d'apparentement présentes dans la population.

Le modèle de Ritland consiste donc principalement à utiliser la relation linéaire reliant la variabilité génétique aux covariances phénotypiques (Équation 13). La nouveauté de cette approche consiste à substituer les coefficients d'apparentement estimés à partir des pédigrées par les coefficients estimés à partir des marqueurs moléculaires. Ainsi si l'on reprend l'équation 13, on obtient :

$$Cov(P_x, P_y) = r_{xy_{estimé}} V_A + \Delta_{xy_{estimé}} V_D + e_{xy} \quad \text{Équation 14,}$$

Avec $r_{xy_{estimé}}$ et $\Delta_{xy_{estimé}}$ les coefficients d'apparement et de fraternité estimés entre l'individu x et l'individu y à partir des marqueurs moléculaires, V_A et V_D , la variation génétique additive et de dominance.

Plus précisément le modèle de Ritland consiste tout d'abord pour un trait donné à calculer des similarités phénotypiques Z_{xy} comme suit :

$$Z_{xy} = \frac{(Y_x - U)(Y_y - U)}{V} = \frac{1}{2V} Cov(P_x, P_y) \quad \text{Équation 15,}$$

Avec Y_x et Y_y , la valeur du trait pour les individus x et y respectivement, U la moyenne phénotypique et V la variance phénotypique.

La combinaison de l'équation 14 et 15, donne le modèle simple d'estimation de l'héritabilité de Ritland (effets additifs des gènes, pas de partage de l'environnement, pas de consanguinité) :

$$Z_{xy} = 2r_{xy_{estimé}} h^2 + e_{xy} \quad \text{Équation 16,}$$

L'originalité de la méthode de Ritland consiste en la prise en compte de la variance d'estimation de l'apparement due aux erreurs d'échantillonnage dans l'estimation de l'héritabilité. En effet, une des conditions préalables de l'utilisation des méthodes de régression classique est que la variable prédictrice soit estimée avec exactitude. Cela est possible en utilisant les pédigrées, mais comme nous l'avons vu l'estimation reposant sur l'utilisation des marqueurs moléculaires souffre d'une grande variation d'échantillonnage. Cela emmène à sous estimer considérablement la valeur d'héritabilité.

Afin de parer à ces problèmes Ritland (1996) a proposé une méthode d'estimation de la variance d'apparement due à la composition en apparentés de la population et réinjecte cette estimation dans l'estimateur de l'héritabilité qui est en fait l'estimateur de la régression des moindres carrés de l'équation 12. Cependant, les tests de cette méthodes ont mis en évidence que la méthode de correction n'est pas suffisante et que une partie du biais demeure (Coltman 2005).

Héritabilité et corrélations génétiques in-situ de traits écophysiologicals foliaires dans une population de Fagus sylvatica exposée au stress hydrique

In-situ heritability and genetic correlations of leaf ecophysiological traits in a population of *Fagus sylvatica* exposed to water stress : application of marker based quantitative genetics

Authors : Aurore Bontemps, François Lefèvre, Hendrik Davi, Sylvie Oddou-Muratorio

Abstract:

Microevolutionary processes are expected to be commonly involved in adaptation of natural population to environmental changes. However this issue is still hardly accounted for, mainly because of high methodological constraints in the estimation of in-situ evolutionary parameters. In plants in particular, the genetic component of the phenotypic variability of leaf functional traits involved in climate adaptation is poorly known. The goal of this study was to estimate heritability and genetic correlations of a suite of leaf functional traits involved in climate adaptation for a natural population of *Fagus sylvatica* using the marker-based quantitative genetics framework developed by Ritland. We successfully estimated significant heritability parameters for leaf phenological (phenology of leaf flush), morphological (mass, area, ratio mass/area) and physiological ($\delta^{13}\text{C}$, nitrogen content, water content) traits. Our results support the usefulness of Ritland's method in cases where a high proportion of related is shown with a strong spatial genetic structure. We conclude that evolutionary shifts of leaf functional trait values in response to future climate changes is likely to occur.

Introduction

Several studies have demonstrated that significant phenotypic shifts attributable to microevolutionary processes can be observed within the span of only a few generations provided that the genetic basis of traits is large enough (Reznick *et al.* 1997, Hendry & Kinnison 1999). An important conclusion of these studies is that microevolutionary processes should often be involved in populations' responses to environmental changes (Hofmann & Sgro, 2011). Although the role of microevolution issue is increasingly recognized in plant species in particular (Davis *et al.* 2005, Jump & Penuelas 2005), the evolutionary potential of populations is still rarely accounted for in models forecasting the response of plant populations to climate change (but see Morin *et al.* 2008, Garzon *et al.* 2011). This could partly be explained by the lack of estimations of evolutionary parameters for natural populations ie : in-situ heritability and genetic correlations, which would inform on their ability to respond to natural selection.

The evaluation of responses of plant populations to environmental changes requires the determination of the level of genetic variability of traits that could be the target of selection. In this study, we focus on adaptation to water stress induced by drought. Mechanisms of plants adaptation to such stresses are usually assumed to involve leaf functional traits, and to rely on the reduction of transpiration rates at the cost of reduced carbon assimilation (Bréda *et al.* 2006, McDowell *et al.* 2008). To date, only few microevolutionary studies have been conducted on leaf functional traits in natural population of plants (Arntz & Delph 2001, Agrawal *et al.* 2008, Donovan *et al.* 2011). These pioneer studies found significant genetic basis for several traits which advocates for the relevance of microevolutionary approaches to understand the response of leaf functional traits to environmental changes (Geber & Griffen 2003, Donovan *et al.* 2011). For example, Agrawal *et al.* (2008) found significant genetic basis for $\delta^{13}\text{C}$, SLA and the carbon-nitrogen ratio in *Asclepias incarnata*. Furthermore, there is a growing body of examples that these traits exhibit ecotypic differentiation along climate gradients (Dudley 1996, Ramirez-Valiente *et al.* 2010, Bresson

et al. 2011) providing strong evidences of their ability to evolve in response to heterogeneous selection (Savolainen *et al.* 2007).

Quantitative genetics provides the framework to address this issue and allows both the estimation of genetic parameters using the genetic relationships between the individuals and, given these parameters, the prediction of the rate of phenotypic evolution in response to natural selection. Considering a multi-trait view of adaptation, the genetic parameters to be estimated together with the estimation of the standing genetic or phenotypic variance of each trait are (1) the narrow-sense heritability h^2 of each trait, which is the proportion of phenotypic variance due to additive genetic effects and (2) the genetic correlations among traits (Lande & Arnold 1983). In practice, the use of quantitative genetics models in natural populations is hampered by major methodological difficulties. Indeed, classical approaches to estimate genetic relationships rely on pedigree data. In natural populations, such data typically requires either careful field observations of mating patterns (which can be highly time demanding) or the sampling of both parent and offspring cohorts and parentage assignments. It has therefore been applied in only a few in-situ studies and mainly in animal species (Kruuk *et al.* 2007, see review in Gay *et al.* submitted). An alternative solution is to estimate quantitative genetic parameters in controlled experiments where pedigrees are partly known (seeds harvested from mother trees, which actually ignores ancestral relatedness among the parents of collected seeds). However even well-designed experiments hardly account for the environmental complexity of natural conditions which may provide biased estimates of genetic parameters and make often desirable to return to the natural environment (Conner *et al.* 2003, Geber & Griffen 2003, Reznick & Ghalambor 2005).

To circumvent these limitations, Ritland (1996) proposed a model approach which relies on marker-based pairwise relatedness estimates and phenotypic similarity to estimate heritability and correlations of the traits of interest through linear regression. Such an approach is of interest for long-lived trees, where

complete pedigree reconstruction based on parentage assignments is hardly applicable due to the limited number of accessible generations. Furthermore, in many plant species, fine scale spatial genetic structure (SGS) i.e. the spatial clustering of related individuals is generated by seed (and to a less extent by pollen) dispersal limitations and to other factors such as the mating system or the demographic history of the population (Vekemans & Hardy 2004). This should be a useful property for in-situ studies, the few available studies that use Ritland's method concluding that SGS may be a fundamental prerequisite to have good inference power because it ensures high levels of relatedness (Andrew *et al.* 2005, Bouvet *et al.* 2008). Finally, another property of the Ritland's method is to account for the potential confounding effect of environmental share between relatives which is known to inflate heritability estimations. This may be an important issue in natural plant populations where dispersal is mostly restricted and environment structured into coarse patches.

Studies using this method provided contrasting conclusions about its relevance in the estimation of genetic parameters. Indeed, using the raw regression of phenotypic similarities against genetic relatedness, heritability is expected to be greatly underestimated because of the marker-based estimations of relatedness does not meet a basic assumption of standard least square regression suffering great sampling variance (Ritland 2000, Van De Castele *et al.* 2001). Ritland proposed a corrective procedure to fix this problem but still, it seems that estimations carry some bias, which makes this method inappropriate for the purpose of exact predictions (Coltman 2005). However, provided the variance in relatedness of the population is high enough, Ritland's method can be useful to detect high heritability and to compare evolutionary potential of different traits within populations (Andrew *et al.* 2005, Coltman 2005). In a recently published study, Castellanos *et al.* (2011) successfully linked in-situ estimates of heritability with observed evolutionary patterns in the *Aquilegia* genus.

The goal of this study is to measure in-situ both heritabilities and genetic correlations of a suite of traits related to water economy and carbon acquisition in a natural population of European beech (*Fagus*

sylvatica L). *F. sylvatica* is one of the main European forest tree species, and its distribution range is constrained by climatic variable related to water availability. For more than 140 adult trees in a single population, we measured leaf $\delta^{13}\text{C}$ as a surrogate of water use efficiency (WUE), leaf mass area (LMA) and its components, nitrogen content, leaf water content and phenology of leaf flush. We assume that the fitness of the studied population is constrained by water resources, thus any genetic variability in the studied traits should be translated into an evolutionary response of these traits. Moreover, because multiple traits are likely to be involved in adaptation to water shortages, an integrated understanding of adaptation requires to account for the genetic correlations between them (Lande & Arnold 1983, MacColl 2011).

All the adults trees were genotyped using a set of 19 variables microsatellites. Once we ensured that our dataset provides relevant genetic parameters, we interpreted the results in terms of the evolutionary potential of leaf functional traits. We first discussed the meaning of the heritability additive variance values. Finally, we refined this hypothesis according to the inferred pattern of genetic correlations that may impose genetic constraints on its evolution.

Material and method

Studied species

European beech (*Fagus sylvatica*, Fagaceae) is distributed from the northern part of the Mediterranean region to the south of Sweden. It is a monoecious, anemophilous, mainly outcrossing species (Merzeau *et al.* 1994). Seeds consist of two nuts within a soft-spined husk. Individuals typically begin to reproduce after 40 to 50 years and seeds are produced in irregular mast years. The European jay is the main long-distance seed disperser, however most seeds are dispersed over short distances by gravity, and secondarily by an assemblage of rodents and birds that scatter hoard them (Nilsson 1985; Jensen 1985). In Mont Ventoux, average distance of seed dispersal was estimated to range between 11.9 and 21.7 m, while average distance of pollen dispersal were estimated to be between 15.8 and 48,2 m (Bontemps *et al.* submitted). Common Beech is a shade-tolerant species requiring high atmospheric humidity due to a weak tolerance to summer drought.

Study site

The study site is located on the Mont Ventoux, 1909m in elevation (South-Eastern France, 44°10'28"N; 5°16'16"E). The forest stands are dominated by beech and silver fir although silver fir suffers much higher mortality rates since the last years (Cailleret & Davi 2010). Common beech recently recolonized the slopes of the Mount Ventoux under the black pines (*Pinus nigra*) which were planted at the end of the 19th century as part of a massive national afforestation program. A previous study have shown that on Ventoux there is a strong micro-scale variation of water capacity (Nourtier *et al.* in press).

The study plot has an area of 0.83 ha and an elevation range of 987m to 1048m. As in Mont Ventoux, common beech ranges from 750m to 1695m in elevation, the studied plot is thus at the low altitude of beech range. The climate conditions Mediterranean ie characterised by a hot dry summer and rainfalls mostly occurring in autumn. Temperature, relative humidity and rain events were recorded from 2007 to

2010. Temperature and relative humidity were recorded using a Prosensor V2 air temperature/relative humidity sensor (U23- 001 \pm 0.2 ° C; \pm 2.5% RH)

In Mont Ventoux, beech is often found in clusters of multiple stems due to root suckering or resprouting (favoured by coppice management). In the study plot ~75% of beech trees were found in such clusters, probably due to the former intensive exploitation of beech wood for firewood production.

Within the site, we exhaustively mapped 149 adult non-clonal individuals with diameter > 12cm. In case of cluster, only the biggest stem (generally dominant) of the cluster was sampled for trait measurement. Additionally we checked for the presence of clones among visually-defined clusters using genetic analysis (see Lander *et al.* 2011 for details) and kept only the biggest individual in case of clones. Spatial coordinates were measured using a Trimble GPS (precision < 1 m). Diameter at 1.3m above ground (dbh) was measured for each of the 149 individuals and all the stems of the clusters. The competitive status was recorded following three classes: 1) Dominant; 2) Co-Dominant; 3) suppressed. Finally, we exhaustively mapped all the competitor individuals of the 149 beech individuals, and recorded their species and dbh.

Measurement of leaf functional traits

Leaf flush phenology records : We recorded the *in-situ* dynamics of leaf flush for 146 among the 149 initially identified individuals. We decided not to record 3 trees because despite they satisfied the requirement of diameter, because they were too highly dominated. We monitored the leaf unfolding stages twice a week. Five stages were used (for more details see Davi *et al.* 2011) to accurately quantify leaf unfolding dynamics (in bracket we give the correspondence with international code). 1: buds are dormant (BBCH code 0); 2: buds are swelling (BBCH code 1); 3: bud scales are broken (BBCH code 3); 4: leaves are emerging (BBCH code 7); 5: leaves are spread out (BBCH code 9). In 2009, the recording period lasted from the 23rd of March to the 4th of May. In 2010 it lasted from the 8th of April to the 10th of May. The scores (from 1 to 5) are summed at every date of measurement to calculate for each tree a PSS (phenology score sum).

Higher is the PSS at a given date of measurement earlier and quicker is the process of leaf unfolding for the studied tree.

Morphological and physiological measures : In the second week of July 2009, 137 trees were climbed to collect three light exposed branches in the highest part of trees crown. The branch part carrying the ten terminal leaves was slipped into a plastic bag, immediately put in a ice filled isotherm box. Branch cuts were stored at 4°C.

Wet mass and area of the ten terminal leaves were measured for each three branches. The leaf area (LA) was measured using a leaf area meter (Delta-T Area meter, Delta-T Devices Ltd., Cambridge, UK). Afterwards, leaves were oven-dried at 65°C during 48h. Dried mass of the ten terminal leaves was then measured (LM). LWC was calculated as the ratio of wet mass minus dry mass and wet mass. LMA was calculated as the ratio of dried mass and area of the ten terminal leaves. After morphological analyses were all completed, among the three branches per tree, the one having the highest LMA was sent for carbon isotope and nitrogen analysis.

Carbon isotope and nitrogen analysis were conducted in the laboratory of forest ecophysiology, INRA Nancy (North Eastern France). Carbon isotope composition was measured using a continuous flow isotope mass spectrometer coupled to an elemental analyser (Roussel *et al.* 2009). The relative abundance of delta 13C was expressed as:

$$\delta^{13}C = \frac{(R_s - R_b)}{R_b} \times 1000$$

where R_s and R_b refers to the $^{13}C/^{12}C$ ratio of the sample and in the Pee Dee Belemnite standard respectively.

In parallel to isotope analysis, leaf nitrogen content defined as the quantity of nitrogen per unit leaf mass (N_{mass}) was also measured with the elemental analyser coupled with the mass spectrometer.

Genotyping and genetic analysis

All individuals were genotyped at 19 microsatellite markers in three multiplexes : **(1)** FS1-15, FS3-04 (Pastorelli *et al.* 2003); sfc0007-2, sfc0018, sfc0036, sfc1063, sfc1143, **(2)** sfc0161 (Asuka *et al.* 2004); csolfagus-7, csolfagus-10, csolfagus-13, csolfagus-19, Fi-05, **(3)** csolfagus-5, csolfagus-6, csolfagus-25, csolfagus-29, csolfagus-31, (Vendramin, pers.comm.); mfc7 (Tanaka *et al.* 1999). We used the original PCR conditions given by the authors. PCR products were separated on an automated 96-capillary MegaBACE™ 1000 sequencer (GE Healthcare). Genotypes were sized using the internal size standards ET400 and the MegaBACE™ Fragment Profiler ver. 1.2 software (GE Healthcare). Automatic allele assignment was checked and revised manually twice to ensure consistency of genotyping.

Population genetic parameters and test of the F_{is} significance was performed with FSTAT (Goudet 1995). The loci were also tested for linkage disequilibrium in FSTAT. Null allele frequencies (NAF) per locus and per population were estimated using the ML-null software (Kalinowski & Taper, 2006). The impact of null alleles on relatedness estimations have to our knowledge never been investigated. However considering the estimated weak null allelic frequencies, we hypothesize that it will have only a limited impact on heritability estimations regarding the other sources of bias.

Relatedness estimates and spatial genetic structure

We calculated pairwise relatedness r_{ij} among all pairs of individual i and j using Lynch and Ritland estimator (1999) [LR] as implemented in the software Spagedi (Hardy & Vekemans 2002). After comparing various relatedness estimators implemented in Spagedi, we decided to retain LR to estimate r_{ij} because for our dataset it provides estimates suffering less sampling variance for the unrelated class. Given the high expected number of unrelated pairs, we assume that the use of LR increases the accuracy of heritability and genetic correlations estimations compared to the other estimates. We also estimated the “actual” variance $\text{var}(r_{ij})$ using the corrective scheme of Ritland implemented in Spagedi to correct heritability estimates (see

“Marker-based heritability estimations” section). Because the effect of r_{ij} estimator on the performance of estimation of $\text{var}(r_{ij})$ is poorly known, we computed $\text{var}(r_{ij})$ using all the four estimators available in Spagedi : LR plus three other estimators, developed respectively by Queller and Goodnight (1989) [QG], Li (1993) [LI] and Wang (2002) [WG]. Finally, we computed the statistical variance of relatedness for the four estimators (LR, QG, LI and WG), to compare the estimations 1) among the different estimators and 2) with estimations made of actual variance.

Spatial analysis : We characterized the level of SGS in the studied population by the relationship between spatial distance and the relationship coefficient r_{ij} (Lynch & Ritland 1999). Moreover, within bins of distances, r_{ij} values were averaged and both actual variance of relatedness $\text{var}(r_{ij})$ and statistical variance of relatedness were estimated. The sample was used to estimate allelic frequencies. For each estimators, $\text{var}(r_{ij})$ and $\text{var}_{\text{stat}}(r_{ij})$ calculated as the variance of the estimate of relatedness were plotted against distance.

The significance of SGS was tested by 5000 random permutations of the individual genotypes across spatial positions. Standard errors around $r_{ij}(d)$ and $\text{var}(r_{ij})$ were obtained with jackknifing procedures that consisted in deleting one locus at a time and re-estimating mean relatedness per distance class and actual variances in relatedness. The intensity of SGS was characterised by the slope b of the regression of r_{ij} against the logarithm of distance. These calculations were done using Spagedi (Hardy & Vekemans 2002).

Marker-based heritability estimations :

We estimated the heritability of all studied functional traits using the regression method proposed by Ritland (1996). This method consists in estimating h^2 by regressing the phenotypic similarity between a pair of individuals i and j (Z_{ij}) against their relatedness (r_{ij}), with Z_{ij} calculated according to :

$$Z_{ij} = \frac{(P_i - \bar{P})(P_j - \bar{P})}{\text{var}(P)} \quad \text{Eq 1.}$$

here P_i, P_j stand for phenotypic values of individuals i and j .

The full multiple regression described in Ritland (1996) accounts for additive genetic effects, the sharing of environments between relatives, dominance genetic effects and inbreeding depression effects on the phenotypic similarities, which gives the following model (i.e. equation 11 in Ritland 1996):

$$Z_{ij} = a_e - 2h^2 r_{ij} + b_e d_{ij} + 2\phi_{ij}(H - h^2) + f_{2ij} b_{f^2} + e_{ij} \quad \text{Eq 2.}$$

Here, we assumed that the term describing the dominance genetic effects ($2\phi_{ij}(H - h^2)$) and the term describing the inbreeding depression effects ($f_{2ij} b_{f^2}$) were negligible and we thus used a model with three parameters : h^2 the narrow-sense heritability, b_e the decrease of environmental correlation per meter and a_e the intercept (Ritland 1996):

$$Z_{ij} = a_e + 2 h^2 r_{ij} - b_e d_{ij} + e_{ij} \quad \text{Eq 3.}$$

For a pair of individual i and j , the predictor variables are : r_{ij} the relatedness and d_{ij} the euclidean spatial distance.

Least square resolution of these equation gives the following estimates of h^2 , b_e and a_e : (Andrews *et al.* 2005, correcting an error in the original publication)

$$\hat{h}^2 = \frac{\text{cov}(\hat{r}_{ij}, Z_{ij}) \text{var}(d_{ij}) - \text{cov}(d_{ij}, Z_{ij}) \text{cov}(\hat{r}_{ij}, d_{ij})}{2(\hat{v} \hat{r}(r_{ij}) \text{var}(d_{ij}) - \text{cov}(\hat{r}_{ij}, d_{ij})^2)} \quad \text{Eq 4.a}$$

$$\hat{b}_e = \frac{\text{cov}(d_{ij}, Z_{ij}) \hat{v} \hat{r}(r_{ij}) - \text{cov}(r_{ij}, Z_{ij}) \text{cov}(r_{ij}, d_{ij})}{2(\hat{v} \hat{r}(r_{ij}) \text{var}(d_{ij}) - \text{cov}(\hat{r}_{ij}, d_{ij})^2)} \quad \text{Eq 4.b}$$

$$a_e = \bar{Z}_{ij} - \bar{r}_{ij} \hat{h}^2 - \bar{d}_{ij} \hat{b}_e \quad \text{Eq 4.c}$$

With \hat{r}_{ij} the molecular-based estimated pairwise relatedness between individuals i and j , and $\widehat{var}(r_{ij})$, the estimation of the actual variance of relatedness.

Ritland proposed to set a cut-off distance beyond which pairs of individuals (expected to be more frequently unrelated) are excluded from the analysis. We computed three sets of parameters : 1) with no cut-off distances (NoCut-off), 2) with a cut-off distance of 15m (15Cut-off) and 3) with a cut-off distance of 30m (30Cut-off).

Marker-based genetic correlation estimations: The genetic correlations are obtained by calculating the additive genetic covariances scaled by the root square of the product of the additive genetic variances of both traits. Following Ritland's model (equation 6d, 1996), it gives the following estimates of the genetic correlation between trait 1 and trait 2 (cor_{12}):

$$cor_{12} = \frac{cov(Y_{ij1}, \hat{r}_{ij})}{\sqrt{cov(Y_{ij1}, \hat{r}_{ij})cov(Y_{ij2}, \hat{r}_{ij})}} \text{ Eq 5.}$$

Y stands for the non standardized phenotypic similarity differing from Z because there is no division by the phenotypic variance $var(P)$ as compared with Eq 1.

Because the calculation of the genetic correlations does not involve the use of actual variance in relatedness, Ritland predicted that they would suffer no statistical bias oppositely to heritability. However, they are expected to suffer much higher sampling variance.

Test of statistical significance of the genetic parameters' estimates: To obtain the statistical distribution of heritability estimates under the null hypothesis that heritability is equal to zero, we

permuted 1000 times the phenotypic values among individuals and checked whether the estimated parameter fell out of the 95% limit. This procedure allows to keep the spatial structuring of relatives allowing to test the significance of b_e , but removes the inflation of h^2 due to the sharing of environments making us potentially too much confident in the significance of h^2 . However considering that estimated h^2 are free from environmental effects, this procedure should provide a good testing of h^2 significance.

Results

Microsatellite diversity and SGS

The number of alleles ranged from 4 to 16 per locus with an average of 8.42 alleles per locus (Table 1), which gives a total of 160 total number of alleles. This value falls within the range of previous studies that used marker-based estimates of heritability (113 total number of alleles in Andrew *et al.* 2005, 142 total number of alleles in Bouvet *et al.* 2008). The observed heterozygosity H_o ranged from 0.36 to 0.88 with on average $H_o=0.67$. Using the Bonferroni corrected p-value there was no significant linkage between loci nor significant F_{is} values. Overall, loci suffered low null allelic frequencies ($NAF_{mean}=0.017$), but two loci were more prone to high NAF: sfc0018 ($NAF=0.087$) and csolfagus-10 ($NAF=0.104$).

The studied population displayed a strong SGS ($b_1= -0.026 [-0.028 ; -0.023]$). The mean relatedness per distance class was significant for the first ($p_{val}<0.001$) and the second ($p_{val}=0.005$) distance class becoming non significant from about thirty meters.

Distribution of relatedness and variance

In agreement with the observation of a strong SGS, both $var_{stat}(r_{ij})$ and $var(r_{ij})$ calculated with the four coefficients were found to decrease with increasing cut-off distance (Figure 1). Actual variances always remained greater than zero, whatever the cut-off distance used.

When comparing the statistical variance of relatedness among the four estimators, we found that estimations made with LR differently behaved from the other coefficients providing much lower estimations and being much closer to the actual variance (Figure 1). This means that in our population, LR performed best in minimizing the sampling variance for the whole data set.

When the cut-off distance was large, the estimate of actual variance was reduced in particular for QG, WG and LI. When the cut-off distance was short, there was also a strong reduction between statistical and

corrected variances estimated with QG, WG and LI but not with LR. The corrective procedure was found to perform equally well with the investigated estimators with no significant differences found among the four coefficients for all cut-off distances (Table 2).

Heritability estimations

We present in table 3 both corrected (h^2_{cor}) and non corrected heritability (h^2_{raw}) for all functional traits for the three sets of cut-off distances (NoCut-off, 15Cut-off, 30Cut-off) and the associated distance parameter b_e . First considering h^2_{cor} for the NoCut-off dataset, we found significant heritability for LA, LM, N_{mass} , $\delta^{13}C$, SSP for both years while LMA, and LWC were found to present only plastic variations. b_e was found to be significant for LMA which lead to a strong decrease of h^2_{cor} (data not shown). Considering h^2_{cor} for the 15Cutoff and the 30Cutoff datasets, we found almost the same pattern, with however SSP of the year 2010 being not anymore significant for the 30Cutoff dataset and LA being not significant for both datasets. The strong decrease of SSP was associated to a high and significant value of b_e . b_e remained significant for LMA at a cut-off distance of 30m but not at 15m.

Overall, there was a strong increase between h^2_{raw} and h^2_{cor} for the NoCut-off dataset. The increase was much less strong for the 30Cut-off and the 15Cut-off datasets (Table 3). h^2_{raw} increased as the cut-off distance decreased. It was no longer the case with h^2_{cor} that had similar values among the different datasets.

Genetic and phenotypic correlations

Because if among the two traits compared at least one has a null heritability the genetic correlations are also expected to be null, we have to interpret with caution the coefficients found between LMA and LWC with the other traits. The coefficients for which both traits were found to have a significant heritability (in bold in Table 4) are first described. Overall, genetic correlations were low (Table 4). First, we found a very

strong genetic correlation between LA and LM. We also found that they were both strongly linked with N_{mass} . Both $\delta^{13}\text{C}$ and SSP presented low genetic correlations with the other traits.

In general, phenotypic correlations had the same signs than genetic correlations but more generally, they had both similar values, genetic correlations being a bit higher than phenotypic correlations. The strong genetic correlations found between LA and LM and between these two variables and N_{mass} was also found at the phenotypic level. Moreover phenotypic correlations between SSP2009 and the other variables (LA, LM, N_{mass} and $\delta^{13}\text{C}$) despite low were found to be significant. We note that the phenotypic correlations ($\text{cor}=0.49$) between the two years of SSP were much lower than the genetic correlations that nearly equalled 1. Although the genetic correlations between LMA and LWC with the other variables were supposed to be close to zero, this was not reflected in our results with rather high values observed.

Discussion

The goal of this study was to estimate in-situ both heritability and genetic correlations of a suite of leaf functional traits involved in drought adaptation for an adult population of *Fagus sylvatica*. For that purpose, we applied the methodology developed by Ritland (1996) that relies on the use of molecular markers to estimate pairwise relatedness. In the first section, the performance of the estimations made with this methodology is discussed and in the second section we discuss the evolutionary implications of our results.

Performance of estimations

The relatively high level of polymorphism associated to microsatellite data likely guaranteed the high detection power of our dataset. However, the polymorphism level was roughly similar to those of the previous studies that used Ritland's method, including those that failed to detect significant heritabilities (Bouvet *et al.* 2008). Comparison of these studies stresses the importance to ensure a high level of relatedness by choosing populations presenting high level of SGS, even with highly polymorphic molecular markers. We found in our population the presence of a strong SGS ($Sp=-0.026$; Vekemans & Hardy 2004) associated with significant amounts of variance in relatedness (=actual variance estimations) whatever the cut-off distance. In agreement with the hypothesis that the detection power depends on the presence of a SGS, we were able to demonstrate significant heritabilities for several traits. The level of SGS is relatively strong considering the life history traits of common beech. Indeed Vekemans & Hardy (2004) found that low levels of relatedness are usually associated to species that are outcrossed, anemophilous, zoochorous and to tree life forms. This may indicate the prevalence of the barochorous primary dispersal. We studied here a recolonizing population, which may be the reason why it displays such strong SGS. Additionally, we have demonstrated in a previous study, restricted dispersal abilities in Beech on Mont Ventoux (Bontemps *et al.* submitted) which can also generate strong SGS (Vekemans & Hardy 2004). Life history traits could serve as a criteria to select good candidate species to Ritland's method ie species likely to display strong SGS. For

example, selfed species should be especially appropriate given their usually found strong SGS (Vekemans & Hardy 2004, Gay *et al.* submitted).

Because of the sampling variance inherent to the estimation of relatedness with molecular markers, the variance of relatedness of the population is expected to be overestimated (Ritland 1996). Van de Castele *et al.* (2001) have investigated how the variance of relatedness in the population affected the proportion of variance of relatedness estimated from microsatellites using various estimator, by crossing different population composition in relation with different polymorphism levels of microsatellite data. They found that both absolute and relative performance of the different estimators vary accordingly to both factors. Csillery *et al.* (2006) argued that they simulated too high variance of relatedness compared to the levels expected in outbred populations. In our case, we found that LR performed best in minimizing the sampling variance for the whole population which may originate from its greater ability to minimize the sampling variance in the unrelated class associated with a likely high proportion of unrelated pairs (Csillery *et al.* 2006).

In our study, the corrective procedure proposed by Ritland (1996) did not perform equally well in reducing the statistical variance of relatedness according to the cut-off distance considered. This is probably due to a change in the composition of relatedness pairs of the population, the mean relatedness increasing as the cut-off distance decreases. We indeed observe that the actual variance of relatedness converged toward the statistical variance calculated with LR with the decrease in cut-off distance. Because we do not have pedigree data, it is impossible to conclude that the actual variance has been successfully recovered, but previous studies have shown that correction often still overestimates it (Coltman 2005). Our findings sustain these results as the actual variance converged towards statistical variance in some cases and that statistical variance is always an overestimation of the true variance. The corrective procedure proved here to be useful when the variance in relatedness is low as it is the case when the whole pairs of individuals are considered.

Evolutionary potential

The ability of a population to produce evolutionary response to natural selection is conditioned by the heritability and the genetic variance of phenotypic traits and also by their genetic correlations. First, we found significant levels of heritability for several leaf functional traits ie leaf mass, $\delta^{13}\text{C}$, N_{mass} and phenology of leaf flush while LMA, leaf water content and leaf area do not have significant heritability their variability being only attributable to plasticity. Given the low inference power usually associated to the Ritland's method, a reasonable assumption would be that those traits that are significant, also possess a high genetic basis and may thus evolve rapidly if they are under selection. Geber & Griffen (2003) have shown in a meta-analysis that physiological traits are more heritable than morphological traits, which we confirm here, except for leaf mass. They have also shown that phenological traits are among the least heritable traits but leaf flush phenology was not included in the analysis and common garden experiments tend to show that it is a highly heritable trait (Savolainen *et al.* 2007). Initially $\delta^{13}\text{C}$ is expected to be highly plastic in natural populations because of a high responsiveness of stomata closure to water resources heterogeneities. Thus the relatively high heritability of the population may originate from low water resource heterogeneities which is unlikely (Nourtier *et al.* in press) or because of a high genetic variability of this trait. Numerous studies have shown a genetic determinism of $\delta^{13}\text{C}$ variability and that the ranking of genotypes is consistent among different environments (Dawson *et al.* 2002). Complementary analysis using oxygen isotopes should help to check stomata responses and better separate plastic and genetic responses (Dawson 2002, Voltas *et al.* 2008).

Regarding accounts of environmental share between relatives, we have to interpret carefully our results. Indeed, it appears that when significant, or marginally significant, environmental share between relatives was detected, heritability was no longer significant. In some case, this share may be poorly accounted for, preventing to remove its effect from heritability estimations. This is probably the case of SSP of the year 2010 that has a suspiciously high value of h^2 . The reverse is also true and the model of environmental effect on phenotypic similarity may remove too much of h^2 , highly decreasing the inference power. It would be

worth conducting characterisation of the micro-scale environment to better account for environmental share.

Analyses of common garden experiments have evidenced both a high degree of adaptive genetic diversity in tree species for several leaf functional traits and rapid evolutionary responses to past local selection (Savolainen *et al.* 2007). In theory, selection depletes genetic variability (but see maize study), and if spatially heterogeneous selection can help to maintain a high genetic diversity over a species range, the maintenance of a high amount of genetic variability within populations is uncertain. In the studied population, despite the likely strong selection pressures exerted by water shortages, there is a high genetic variability for several leaf functional traits related to water economy. Several hypothesis can be evoked that can help to maintain genetic diversity. First, gene flow is classically evoked because it can promote within population genetic diversity by counteracting the effect of drift and selection through the homogenisation of gene frequencies among populations. Second, selection patterns may vary between years and sometimes reverses which can thus favour the maintenance of genetic diversity (Bell 2010). Finally, we have evidenced that traits interact together to determine plant performance and this may favour the maintenance of genetic variability in case of there are several well adapted combinations. Although a rigorous test of the adaptive value of the studied trait is needed, the rapid evolution of the population in response to future climatic pressures is expected, being mediated by those adaptive traits possessing a high genetic basis.

On the other hand, the evolution of these traits may be hampered by their genetic correlations that would conflict with antagonistic selection (Futuyma 2010). In our case, this may concern not all but some of the traits. First, leaf mass and leaf area are tightly linked both at the phenotypic and the genetic levels, which probably originates from structural constraints: leaves that increase in size mechanically also increase in mass which may pose serious constraints to evolution of these two traits. This also concerns nitrogen content that covary negatively with both leaf mass and leaf area, probably because the individuals are limited in their ability to uptake nitrogen. Thus, if nitrogen content is adaptive, then the evolution of leaf morphology may be constrained by their genetic correlations with this trait. Finally, both phenology of leaf

flush and leaf $\delta^{13}\text{C}$ present low genetic correlations with the other traits and their evolution should not be constrained by antagonistic selection applying on the other leaf functional traits.

Conclusion

Using molecular based approaches in a population of *Fagus sylvatica*, we successfully estimated significant heritability for several leaf functional traits that are leaf area, leaf mass, leaf nitrogen content, $\delta^{13}\text{C}$ and phenology of leaf flush while variations of LMA and leaf water content appear to be only driven by the environment. These results indicate a potential for rapid evolution of traits presenting significant heritability values. However, the evolution of leaf morphological traits and of nitrogen content may be constrained by high genetic correlations if antagonistic selection occurs. We conclude that evolutionary shifts of leaf functional trait values in response to environmental changes are likely to occur in the studied population. Our study is another demonstration that marker-based approaches can be a useful tool to investigate the evolutionary potential of wild populations provided that requirements in terms of variance of relatedness are fulfilled. Finally, our findings are consistent with previous studies that predicted a widespread occurrence of evolutionary response to environmental changes in natural populations.

REFERENCES

- Agrawal A.A., Erwin A.C. and Cook S.C. (2008) Natural selection on and predicted responses of ecophysiological traits of swamp milkweed *Asclepias incarnata*. *Journal of Ecology*, 96, 536-542.
- Andrew R.L., Peakall R., Wallis I.R., Wood J.T., Knight E.J. and Foley W.J. (2005) Marker-based quantitative genetics in the wild? The heritability and genetic correlation of chemical defenses in eucalyptus. *Genetics*, 171, 1989-1998.
- Arntz A.M. and Delph L.F. (2001) Pattern and process: evidence for the evolution of photosynthetic traits in natural populations. *Oecologia*, 127, 455-467.
- Asuka Y., Tani N., Tsumura Y. and Tomaru N. (2004) Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Molecular Ecology Notes*, 4, 101-103.
- Bouvet J.M., Kelly B., Sanou H. and Allal F. (2008) Comparison of marker- and pedigree-based methods for estimating heritability in an agroforestry population of *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (shea tree). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 1291-1301.
- Bresson C.C., Vitasse Y., Kremer A. and Delzon S. (2011) To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology*, 31, 1164-1174.
- Castellanos C.M., Alcantara J.M., Rey P.J. and Bastida J.M. (2011) Intra-population comparison of vegetative and floral trait heritabilities estimated from molecular markers in wild *Aquilegia* populations. *Molecular Ecology*, 20, 3513-3524.
- Coltman D.W. (2005) Testing marker-based estimates of heritability in the wild. *Molecular Ecology*, 14, 2593-2599.
- Conner J.K., Franks R. and Stewart C. (2003) Expression of additive genetic variances and covariances for wild radish floral traits: Comparison between field and greenhouse environments. *Evolution*, 57, 487-495.
- Csillery K., Johnson T., Beraldi D., Clutton-Brock T., Coltman D., Hansson B., Spong G. and Pemberton J.M. (2006) Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. *Genetics*, 173, 2091-2101.
- Davi H., Gillmann M., Ibanez T., Cailleret M., Bontemps A., Fady B. and Lefevre F. (2011) Diversity of leaf unfolding dynamics among tree species: New insights from a study along an altitudinal gradient. *Agricultural and Forest Meteorology*, 151, 1504-1513.
- Davis M.B., Shaw R.G. and Etterson J.R. (2005) Evolutionary responses to changing climate. *Ecology*, 86, 1704-1714.
- Donovan L.A., Maherali H., Caruso C.M., Huber H. and de Kroon H. (2011) The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *Trends In Ecology and Evolution*, 26, 88-95.
- Dudley S.A. (1996) The response to differing selection on plant physiological traits: Evidence for local adaptation. *Evolution*, 50, 103-110.
- Garzon M.B., Alia R., Robson T.M. and Zavala M.A. (2011) Intra-specific

- variability and plasticity influence potential tree species distributions under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 20, 766-778.
- Geber M.A. and Griffen L.R. (2003) Inheritance and natural selection on functional traits. *International Journal of Plant Sciences*, 164, S21-S42.
- Goudet J. (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- Hardy O.J. and Vekemans X. (2002) SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2, 618-620.
- Hendry A.P. and Kinnison M.T. (1999) Perspective: The pace of modern life: Measuring rates of contemporary microevolution. *Evolution*, 53, 1637-1653.
- Jensen T.S. (1985) Seed-seed Predator Interactions of European Beech, *Fagus-sylvatica* and Forest Rodents, *Clethrionomys-glaureolus* and *Apodemus-flavicollis*. *Oikos*, 44, 149-156.
- Jump A.S. and Penuelas J. (2005) Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters*, 8, 1010-1020.
- Kalinowski S.T. and Taper M.L. (2006) Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 7, 991-995.
- Kruuk L.E.B., Slate J. and Wilson A.J. (2008) New Answers for Old Questions: The Evolutionary Quantitative Genetics of Wild Animal Populations. *Annual Review Of Ecology Evolution And Systematics*, 39, 525-548.
- Lande R. and Arnold S.J. (1983) The Measurement Of Selection On Correlated Characters. *Evolution*, 37, 1210-1226.
- Lynch M. and Ritland K. (1999) Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, 152, 1753-1766.
- MacColl A.D.C. (2011) The ecological causes of evolution. *Trends In Ecology and Evolution*, 26, 514-522.
- Merzeau D., Comps B., Thiebaut B. and Letouzey J. (1994) Estimation of *fagus-sylvatica* L. mating system parameters in natural populations. *Annals of Forest Science*, 51, 163-173.
- Morin X., Viner D. and Chuine I. (2008) Tree species range shifts at a continental scale: new predictive insights from a process-based model. *Journal of Ecology*, 96, 784-794.
- Oddou-Muratorio S., Bontemps A., Klein E.K., Chybicki I., Vendramin G.G., and Suyama Y. (2010) Comparison of direct and indirect genetic methods for estimating seed and pollen dispersal in *Fagus sylvatica* and *Fagus crenata*. *Forest Ecology and Management*, 259, 2151-2159.
- Pastorelli R., Smulders M.J.M., Van't Westende W.P.C., Vosman B., Giannini R., Vettori C. and Vendramin G.G. (2003) Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology Notes*, 3, 76-78.
- Queller D.C. and Goodnight K.F. (1989) Estimating Relatedness Using Genetic-markers. *Evolution*, 43, 258-275.

- Ramirez-Valiente A.J., Sanchez-Gomez D., Aranda I. and Valladares F. (2010) Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiology*, 30, 618-627.
- Reznick D.N. and Ghalambor C.K. (2005) Selection in nature: Experimental manipulations of natural populations. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 456-462.
- Reznick D.N., Shaw F.H., Rodd F.H. and Shaw R.G. (1997) Evaluation of the rate of evolution in natural populations of guppies *Poecilia reticulata*. *Science*, 275, 1934-1937.
- Ritland K. (1996) Marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution*, 50, 1062-1073.
- Ritland K. (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, 9, 1195-1204.
- Roussel M., Thiec D. I., Montpied P., Ningre N., Guehl J.M. and Brendel O. (2009) Diversity of water use efficiency among *Quercus robur* genotypes: contribution of related leaf traits. *Annals of Forest Science*, 66, 408-408.
- Savolainen O., Pyhajarvi T. and Knurr T. (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review Of Ecology Evolution And Systematics*, 38, 595-619.
- Tanaka K., Tsumura Y. and Nakamura T. (1999) Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F-japonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 11-15.
- Van de Castele T., Galbusera P. and Matthysen E. (2001) A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, 10, 1539-1549.
- Vekemans X. and Hardy O.J. (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921-935.
- Wang J.L. (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160, 1203-1215.

Table 1 : Characteristics of the microsatellite loci and population genetic parameters of *Fagus sylvatica*. n is the number of observed alleles per locus, H_o the observed heterozygosity, H_e the expected heterozygosity. F_{is} the inbreeding coefficient and NAF the frequencies of null alleles. The significance of F_{is} value at 5% confidence level is indicated by *

	n	H_o	H_e	F_{is}	NAF
FS1-15	16	0,71	0,81	0.115	0.045
FS3-04	4	0,47	0,42	-0.123	0
sfc0007-2	6	0,75	0,78	0.032	0.001
sfc0018	10	0,65	0,79	0.173	0.087
sfc0036	9	0,69	0,7	0.017	0.013
sfc1063	8	0,74	0,79	0.052	0.028
sfc1143	9	0,77	0,78	0.019	0
sfc0161	9	0,83	0,79	-0.048	0
mfc7	7	0,74	0,69	-0.071	0
csolfagus-5	8	0,77	0,74	-0.051	0
csolfagus-6	8	0,77	0,82	0.062	0.019
csolfagus-7	9	0,79	0,76	-0.045	0.000
csolfagus-10	9	0,52	0,77	0.221	0.104
csolfagus-13	10	0,68	0,66	-0.029	0
csolfagus-19	10	0,88	0,86	-0.029	0
csolfagus-25	6	0,6	0,64	0.063	0.012
csolfagus-29	6	0,57	0,55	-0.031	0
csolfagus-31	10	0,81	0,74	-0.091	0
Fi-05	6	0,36	0,39	0.085	0.007

Table 2 : Actual variances in relatedness $\text{var}(r_{ij})$ as function of the maximum distance between individuals (cutoff). Relatedness was estimated using alternatively the estimator of LR = Lynch and Ritland (1999), QG = Queller and Goodnight (1989), LI = Li (19?) and WG = Wang (2002). Standard error were calculated by jackknifing.

Cutoff	Nb pairs	$\text{var}(r_{ij})$			
		QG	LR	WG	LI
10	432	0.045±0.011	0.056±0.013	0.049±0.006	0.051±0.007
20	1339	0.028±0.005	0.029±0.007	0.026±0.004	0.028±0.004
30	2443	0.024±0.006	0.019±0.004	0.019±0.003	0.020±0.003
40	3600	0.020±0.006	0.015±0.003	0.015±0.004	0.016±0.003
50	4642	0.017±0.006	0.012±0.002	0.013±0.003	0.013±0.003
60	5751	0.015±0.005	0.010±0.001	0.011±0.002	0.011±0.003
70	6953	0.013±0.005	0.008±0.001	0.009±0.002	0.010±0.002
80	8088	0.011±0.004	0.007±0.001	0.008±0.002	0.009±0.002
90	8961	0.011±0.004	0.006±0.001	0.008±0.002	0.008±0.002
100	9708	0.010±0.004	0.005±0.001	0.007±0.002	0.008±0.002

Table 3 : Estimations of heritability calculated with no correction (h^2_{raw}), with the correction procedure proposed by Ritland (h^2_{cor}) and sharing of environment (b_e) for each studied leaf functional traits (see section “Functional trait measurement”) for three datasets corresponding to no cut-off distance (NOCUTOFF), a 15m cut-off distance (15CUTOFF) and a 30m cut-off distance. Significant parameters at the 5% level are followed by (*).

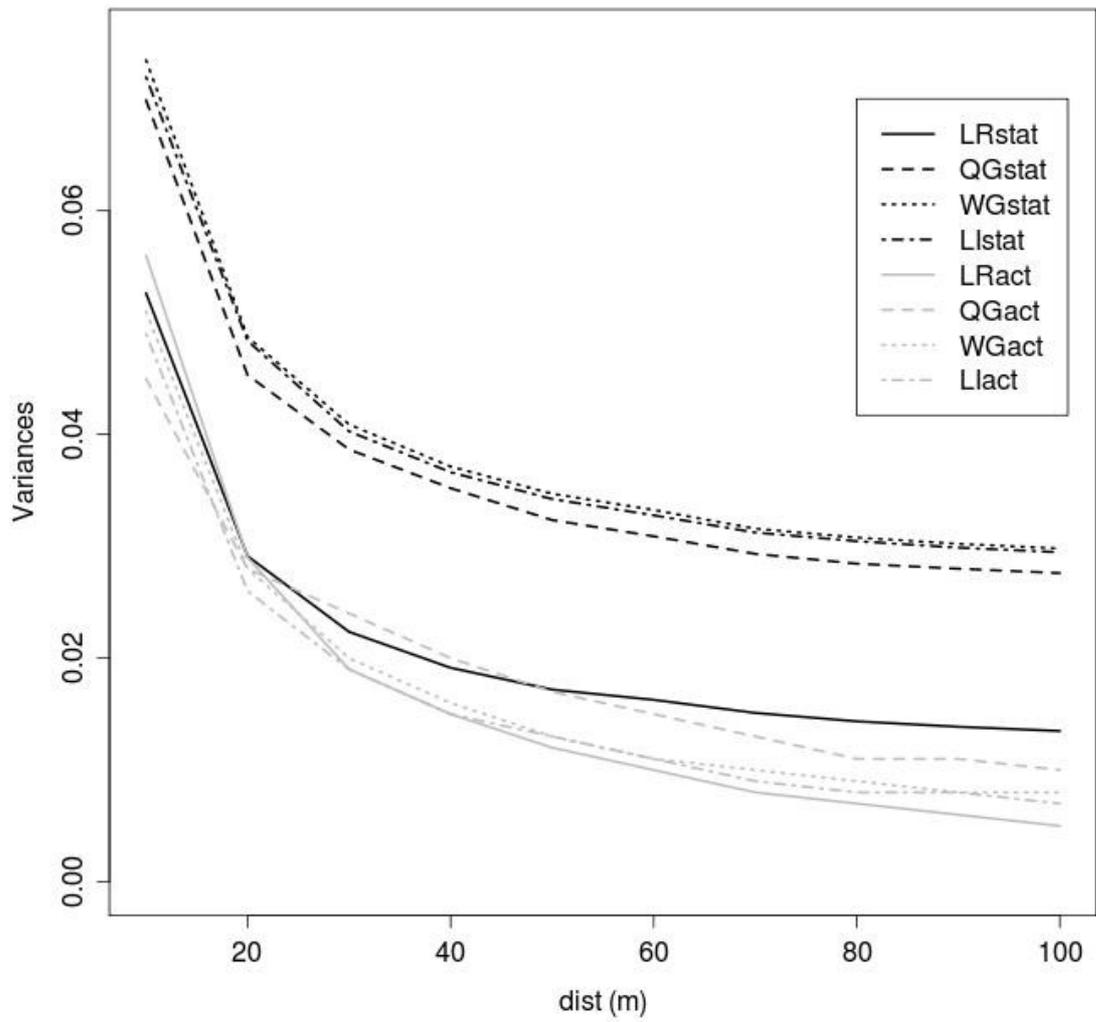
Trait	Year	NOCUTOFF			15CUTOFF			30CUTOFF		
		h^2_{raw}	h^2_{cor}	b_e	h^2_{raw}	h^2_{cor}	b_e	h^2_{raw}	h^2_{cor}	b_e
LMA	2009	-0.04	-0.10	-0.0044*	0.02	0.02	-0.005	-0.06	-0.09	-0.004*
LA	2009	0.09*	0.20*	0.0000	0.13	0.14	0.002	0.06	0.08	-0.002
LM	2009	0.16*	0.39*	0.0000	0.20*	0.22*	0.000	0.13*	0.17*	-0.002
LWC	2009	0.06	0.15	-0.0004	-0.04	-0.04	-0.006	0.04	0.06	-0.002
N _{mass}	2009	0.22*	0.52*	-0.0002	0.48*	0.53*	0.001	0.23*	0.31*	-0.004*
$\delta^{13}C$	2009	0.11*	0.26*	-0.0001	0.27*	0.29*	0.004	0.21*	0.28*	0.000
SSP	2009	0.08	0.18	0.0000	0.25*	0.27*	0.001	0.20*	0.26*	-0.002
SSP	2010	0.26*	0.59*	0.0001	0.15	0.16	-0.012*	0.23*	0.29*	-0.002

Table 4 : Genetic and phenotypic correlations among the studied leaf functional traits (see section “Functional trait measurement”). Genetic correlations are in the lower part and the diagonal and phenotypic correlations are in the upper part of the table. Values in bold indicate that both traits have a significant heritability.

	<i>LMA</i>	<i>LA</i>	<i>LM</i>	<i>LWC</i>	<i>N_{mass}</i>	$\delta^{13}C$	<i>SSP2009</i>	<i>SSP2010</i>
<i>LMA</i>	1	-0.07	0.40***	-0.43***	-0.35***	0.28**	-0.14	-0.12
<i>LA</i>	0.35	1	0.82***	-0.10	-0.71***	-0.02	-0.22**	0.03
<i>LM</i>	0.71	0.95	1	-0.31***	-0.81***	0.16	-0.33***	-0.03
<i>LWC</i>	-0.69	-0.62	-0.74	1	0.24**	-0.07	0.26**	0.12
<i>N_{mass}</i>	-0.65	-0.81	-0.88	0.42	1	-0.13	0.19*	-0.06
$\delta^{13}C$	0.53	-0.20	0.15	-0.37	-0.17	1	-0.25**	-0.20*
<i>SSP2009</i>	-0.34	0.23	-0.04	0.58	-0.45	-0.23	1	0.49***
<i>SSP2010</i>	-0.44	0.65	0.16	0.39	-0.32	-0.13	1.07	1

$p_{val} \leq 0.05$: *, $p_{val} \leq 0.01$: **, $p_{val} \leq 0.001$: ***

Figure 1 : Plot of statistical (suffix : stat) and actual (suffix:act) variance in relatdness calculated with LR, QG, WG and LI (for abbreviations see section “Evolutionary parameters estimations”) against distance.



Chapitre 4.

Évaluation de l'intensité des flux de gène par
voie de pollen et de graine

4) Évaluation de l'intensité des flux de gène par voie de pollen et de graine

Synthèse de l'étude

1) Contexte et objectif

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer le potentiel évolutif d'une population de hêtre commun dans un environnement soumis à de fortes contraintes hydriques. Du fait des variations des fréquences alléliques entre populations (adaptation locale, dérive génétique), les flux de gènes qui homogénéisent les fréquences alléliques peuvent avoir pour effet de faire dévier les prédictions du potentiel évolutif par rapport à celle basées sur l'estimation de la variation génétique observée dans la population focale. Pour répondre à l'objectif général de la thèse, il est donc important d'évaluer les capacités de dispersion du pollen et des graines chez le hêtre et en particulier l'intensité des flux de gènes extérieurs à la population étudiée. Pour cela, nous présentons dans ce chapitre une étude des capacités de dispersion du pollen et des graines dans deux populations de hêtre situées sur le Mont Ventoux. Cette étude a été initiée dans le cadre de mon stage de Master II. Elle repose sur des analyses de parenté sur semis établis, et l'utilisation du modèle de croisement spatialement explicite (SEMM pour Spatially Explicit Mating Model) qui considère une population d'adultes reproducteurs et leurs descendants potentiels et modélise le succès reproducteur individuel estimé à partir d'analyses de parenté en fonction de la distance spatiale des adultes aux semis et de leur fécondité individuelle.

La dispersion du pollen et des graines a été modélisée à l'aide d'un noyau ou kernel de dispersion qui est défini comme la fonction de densité de probabilité bidimensionnelle décrivant la probabilité pour une graine/ un grain de pollen d'être dispersé(e) en tout point de l'espace (Nathan *et al.* 2012). Plusieurs familles de fonctions peuvent être utilisées pour modéliser la dispersion du pollen et des graines chez les plantes (Austerlitz *et al.* 2004, Clark 1999). Elles ont comme propriété commune de modéliser une probabilité de dispersion qui diminue avec la distance mais elles diffèrent dans la modélisation des événements de dispersion à longue distance. La dispersion à longue distance est généralement contrôlée par le paramètre qui détermine la forme de la courbe. Par exemple, si l'on considère la famille des exponentielles puissances, dont la densité de probabilité est donnée par :

$$p_{ep}(a, b; r) = \frac{b}{2\pi a^2 \Gamma(2/b)} \exp\left(-\left(\frac{r}{a}\right)^b\right) \quad \text{Équation 17}$$

Avec a , b , les paramètres du kernel et r la distance (du père à la mère pour le pollen ou de la mère au semis pour les graines). a est un paramètre homogène à une distance. Lorsque le paramètre de forme (b) est inférieur à 1 (sachant que $b=1$ pour une exponentielle), la courbe est dite à queue légère (plus légère qu'une exponentielle) et modélise peu d'événements de dispersion à longue distance ; lorsque ce b est supérieur à un, la fonction est dite à queue lourde et modélise beaucoup d'événements de dispersion à longue distance (Austerlitz *et al.* 2004).

2) Résultat et discussion

Dans ce chapitre est présenté l'article que nous avons soumis à Journal of Ecology. Dans cette étude, nous nous sommes placés dans la problématique générale de l'effet du recrutement du type densité dépendant sur le changement de la courbe de dispersion estimée au stade graine par rapport à celle estimée au stade semis. Tout d'abord, un premier objectif était d'évaluer la sensibilité des estimations obtenues avec le SEMM aux processus de recrutement de type densité dépendant, par une approche de simulations. Nous montrons que le kernel estimé après que les processus de mortalité densité-dépendant aient agi est celui des graines, c'est-à-dire que le SEMM appliqué à de semis établis n'intègre pas les processus de mortalité. Sur la base de ce résultat, nous avons également mis en évidence l'effet de la mortalité sur la dispersion efficace en comparant la distance moyenne de dispersion efficace (dispersion + recrutement) aux stades « semis jeunes » (ayant subi peu de mortalité) et « semis vieux » (ayant subi beaucoup de mortalité). L'originalité de cette étude est de proposer une approche génétique (basée sur le SEMM et les analyses de parenté) sur plusieurs cohortes de semis afin de séparer l'effet de la dispersion et l'effet du recrutement. Nous observons dans le cas du hêtre que la mortalité accroît les distances moyennes de dispersion sur un des deux sites, comme attendu dans le cas de processus de mortalité de type Janzen-Connell..

Pour revenir au contexte général de cette thèse, cette étude nous a permis de tester plusieurs familles de dispersion (exponentielle simple, exponentielle puissance, 2Dt) afin d'évaluer l'étendue de la dispersion et notamment l'importance des événements de dispersion à longue distance. On estime des moyennes de dispersion pour les graines allant de 12 à 25 m et pour le pollen de 15.67 à 72.17 m. Sur le site 1, les meilleures estimations sont obtenues en utilisant la famille des exponentielles puissances pour le pollen et

les graines et les courbes estimées ont des queues lourdes (jeune cohorte : 0.79 ; vieille cohorte : 0.2 ; pollen : 0.47). Sur le site 2, les meilleures estimations de la courbe de dispersion des graines sont obtenues en utilisant la famille 2Dt qui sont une famille de fonction à queue à lourde quelle que soit la valeur du paramètre de forme. En revanche, l'estimation de la moyenne est faible pour le pollen, probablement du fait d'une queue de dispersion très légère (≈ 1.47). Les taux de migration (pourcentage de pollen ou de graines issus de l'extérieur de la parcelle) peuvent être très élevés, mais sont difficile à utiliser dans un contexte prédictif car ils intègrent également des sources d'erreurs (erreur de génotypage, mortalité des adultes).

La dispersion du pollen et des graines se fait donc en majorité à courte distance et les flux de gène le long du gradient sont donc probablement plutôt restreints. Cela accentue le rôle de la variabilité génétique déjà présente dans la réponse évolutive des populations aux changements environnementaux futurs. Néanmoins quelques rares événements de dispersion à longue distance favorisés par la mortalité densité-dépendante ont lieu, ce qui peut favoriser l'adaptation des populations dans le cas où les flux de gène apportent des allèles favorables. Cette question doit donc être approfondie, ce qui sera réalisé dans le cadre de la thèse de Julie Gaüzère qui a pour objet l'étude de l'effet de l'interaction entre les flux de gène et la sélection sur la structuration génétique adaptative de la population du hêtre sur le Mont Ventoux.

Estimation de la dispersion des graines à partir de génotypes de semis établis : est que la mortalité distance-dépendante a une influence ?

Title: Seed dispersal patterns estimated from genotypes of established seedlings: does density-dependent mortality matter?

Authors: Aurore Bontemps¹, Etienne K. Klein^{1,2}, Sylvie Oddou-Muratorio^{1*}

Addresses:

¹ INRA, UR629 Ecologie des Forêts Méditerranéennes (URFM), F-84914 Avignon, France

² INRA, UR546 Biostatistique et Processus Spatiaux (BioSP), F-84914 Avignon, France

***Corresponding author:**

Sylvie Oddou-Muratorio

INRA, Unité de Recherches Forestières Méditerranéennes

Domaine Saint Paul, Site Agroparc

84914 Avignon Cedex 9, France

Fax : +33 (0)4 32 72 29 02

oddou@avignon.inra.fr

Key-words: Spatially Explicit Mating Model, *Fagus sylvatica*, dispersal kernel, microsatellite markers, spatial genetic structure, recruitment

Running title: Dispersal, recruitment, and genetic structure

Submitted to Journal of Ecology

Summary

1. A major challenge in population ecology of long-lived plants is to disentangle the intricate effects of seed dispersal and seedlings mortality on demographic and genetic structure of recruited seedlings.
2. A common way to address this issue is to compare dispersal patterns among seeds (i.e. basic dispersal) and established seedlings (i.e. effective dispersal). High density-dependent mortality near adult plants is expected to shift the mode of the effective dispersal distance away from the mother plant relative to the mode of the basic dispersal distance.
3. Yet, this prediction remains untested for Spatially Explicit Mating Models (SEMM), which typically uses as input spatial and genetic data of parent and seedlings to estimate the seed/pollen dispersal kernels, the rates of seed/pollen immigration and selection gradients on female/male fecundity.
4. Using simulations we first demonstrate that the SEMM estimates the basic seed dispersal kernel, thus without sensitivity to density-dependent mortality. By contrast estimates of seed migration rates can be inflated due to lower mortality among randomly-distributed immigrants relative to locals clustered near parent trees.
5. Second, we investigated basic and effective dispersal in two plots and two seedling cohorts of *Fagus sylvatica* L. using both the SEMM and parentage analyses. Basic seed dispersal was primarily local, with mean distances of 12 to 25 m (young cohort) and 22 to 25m (old cohort). Consistent with the expected effect of density-dependent mortality, the average effective seed dispersal distance increased between young and old cohorts from 33m to 48 m at site 1 and from 23m to 33m at site 2. Migration rates also strongly increased from 12% to 33 % at site 1 and from 20 to 72% at site2.

Synthesis : The major counter-intuitive result of this study is that SEMM estimates of seed dispersal kernels are not sensitive to density-dependent mortality, even though they use as input genetic data from established seedlings that suffered such mortality. We also illustrate how the comparison of basic and effective genetic estimate of seed dispersal can shed light on the interplay between seed dispersal patterns and density-dependent mortality in *F. sylvatica*.

Introduction

Seed dispersal and early seedling recruitment generate the initial template for plant regeneration and can have a strong influence on the demography and evolution of plant populations (Hampe *et al.*, 2010; Nathan & Muller-Landau, 2000). Numerous studies have highlighted the major role of the scale and shape of the seed dispersal curve on spatial patterns of seedlings abundance (Clark *et al.*, 1999a) and on the spatial distribution of genetic variation within populations (Hampe *et al.*, 2010). Furthermore, environmentally-driven mortality and density-dependent mortality (DDM) are known to largely determine the spatial pattern of recruited seedlings and saplings (Clark *et al.* 1999a), and affect the spatial distribution of genetic variation within populations (Alvarez-Buylla *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2003; Hampe *et al.*, 2010). Most importantly, seed dispersal and post-dispersal mortality are intrinsically linked since recruits dispersed far away from their maternal tree have a greater chance to escape from DDM (Hille Ris Lambers *et al.*, 2002). Post-dispersal processes can thus modify the basic seed dispersal pattern into effective dispersal patterns which will be imprinted in later life-stages (Augspurger, 1983).

Life-stage studies take advantage of the difference in basic and effective patterns of dispersal to disentangle the respective roles of seed dispersal and post-dispersal recruitment processes. Because mortality is cumulative over a cohort lifetime, spatial patterns of recruited individuals should become increasingly discordant over time with the spatial patterns of dispersed seeds due to environmentally-driven or density-dependent mortality (Augspurger, 1983). For instance, a survival probability increasing with distance from seed source and/or decreasing with density of conspecifics can lead to the well-known Janzen-Connell (J-C) hump-shaped pattern of establishment: surviving seedlings are at maximum density at an intermediate distance from the mother tree (see also (Hubbell, 1980) and (McCanny, 1985) for alternative expectations). This was demonstrated by Augspurger (1983) in the tropical tree *Platypodium elegans* where seedling mortality is higher close to the mother tree. Life-stage approaches thus require careful separation of the different components contributing to the spatial distribution of seedlings: (1) the spatial distribution and

fecundities of the mother-trees (2) the seed dispersal process and (3) the environmental heterogeneity contributing to mortality.

Separating the different components contributing to regeneration patterns is classically achieved by estimating the seed dispersal kernel, a 2-dimensional probability density function that describes the probability for a seed to disperse to any position relative to the maternal tree (Nathan *et al.*, in press). Two dispersal kernels can actually be defined based on the stage of the recruitment process. The basic dispersal kernel is defined as encompassing only the movement and survival of the seeds during dispersing movements (thus before post-dispersal mortality). The effective dispersal kernel additionally includes the post-arrival survival of seeds which leads to successful establishment (Nathan *et al.*, in press). When survival probability depends on the distance to the nearest adult, the two kernels are expected to differ (Gonzalez-Martinez *et al.*, 2006; Martin & Canham, 2010; Steinitz *et al.*, 2011). In published studies, it is not always clear which kernel is estimated but it seems to be generally accepted that estimations from observed seedlings provide effective dispersal kernels whereas estimations from observed seeds provide basic dispersal kernels. However, we expect that not only the empirical data but also the statistical method used to derive the dispersal kernel will affect its estimation.

Inverse modelling (IM) is the classical statistical method for estimating seed dispersal kernels based on the spatial pattern of dispersed seeds (Clark *et al.*, 1999b). This method accounts for the overlap of seed shadows by comparing seed counts obtained at trapping locations to the expected number of seeds computed from the basic seed dispersal kernel and individual adult fecundities. The method has also been applied to established seedling (Kunstler *et al.*, 2007; Ribbens *et al.*, 1994) in which case IM estimates an effective dispersal kernel which includes germination and early post-dispersal survival. Hence, comparing IM estimates of the basic and effective dispersal kernels in the same species and in the same site allows seed dispersal and post-dispersal mortality processes to be independently estimated (e.g. (Amm *et al.*, in press)). However, using IM to estimate the basic dispersal kernel can pose some challenges. For example, most seed-trap devices do not integrate secondary animal-assisted dispersal. More generally, in masting

species, in species continually producing seeds or when sampling seed just after dispersal is technically complicated, estimating the basic dispersal kernel from established seedlings is a simpler option.

An alternative and increasingly popular statistical approach to estimate seed dispersal kernels relies on genetic parentage assignment (Jones & Hubbel, 2006; Klein & Oddou-Muratorio, 2011; Robledo-Arnuncio & Garcia, 2007). Parentage assignment typically entails mapping of seeds or seedlings and their potential parents within a circumscribed area and genotyping all individuals with hyper-variable molecular markers such as microsatellites. Seed (and putatively pollen) dispersal kernel(s) can be estimated using full-probability methods such as the Spatially Explicit Mating Models (SEMM) (Burczyk *et al.*, 2006; Moran & Clark, 2011; Oddou-Muratorio & Klein, 2008). Similar to IM, SEMM approaches consider the overlap of seed shadows from different mother trees when computing the probability of a given seedling genotype at a given location (Nathan *et al.*, in press). This probability is modelled as a function of the seed and pollen dispersal kernels, the locations and fecundities of adult trees, the genotypes of the candidate parents and the Mendelian probabilities. In contrast with IM, SEMM focus on the composition of seed/pollen pools instead of seed/pollen rain intensity. This is expected to reduce their sensitivity to post-dispersal mortality. However, to our knowledge, no study to date has tested whether SEMM always estimate basic dispersal kernels because of the model they rely on.

Another obvious method to investigate seed dispersal patterns from parentage analyses is to derive the observed distribution of seed dispersal distances from the set of seedlings categorically assigned to their mother-plant, and then to estimate summary statistics (mean, median) or to fit a dispersal kernel (Adams *et al.*, 1992). Because this approach relies on the counts of seed dispersal events as function of the distance of the seed source, it estimates the effective seed dispersal kernel. However, unlike IM, it has the well-known drawback that the distribution of dispersal distances observed directly from parentage assignment is an outcome of both the kernel function and the relative spatial distribution of seedlings and mother-plants, i.e. of the experimental design (Robledo-Arnuncio & Garcia, 2007). Despite its sensitivity to sampling design, categorical parentage assignments are generally considered as a valid approach for the purpose of

comparing effective seed dispersal patterns among cohorts at short temporal scale (e.g. young and old seedlings generated by the same parent trees).

In this study, we used SEMM and categorical parentage assignments to investigate how genetic approaches can disentangle the respective roles of seed dispersal and post-dispersal recruitment process on spatial patterns of genetic diversity in a temperate forest tree. Our first objective was to investigate the impact of DDM on dispersal kernel estimates resulting from SEMM applied to established seedlings. To address this issue, we used simulations of seedling genotypes under realistic dispersal kernels and three levels of DDM to demonstrate that the SEMM actually estimates the basic dispersal kernel. Second, we propose an original two-step procedure using the SEMM and categorical parentage assignments to study the impact of seed dispersal and post-dispersal recruitment on spatial patterns of genetic diversity and we apply it to two cohorts of established seedlings of the European beech (*Fagus sylvatica* L.): (1) a young cohort of newly recruited seedlings which has experienced little recruitment mortality and (2) an old cohort at a later stage of recruitment and constituted by seedlings from several annual dispersal events.

Material and methods

STUDIED SPECIES

Fagus sylvatica (Fagaceae) is distributed from the northern part of the Mediterranean region to the south of Sweden. It is monoecious, anemophilous, and mainly outcrossing. Seeds consist of two nuts within a soft-spined husk. Individuals typically begin to reproduce after 40 to 50 years and seeds are produced in irregular mast years. The European jay is the main long-distance seed disperser; however most seeds are dispersed over short distances by gravity, and secondarily by an assemblage of rodents and birds that scatter hoard them (Nilsson, 1985). The species has been shown to be subject to DDM in the study site (Sagnard *et al.*, 2007).

STUDY SITES

The two study sites are located on the Northern slope of Mont Ventoux (south-eastern France). They are dominated by *F. sylvatica* and *Abies alba*, which recently re-colonised Mont Ventoux after massive plantation of European black pines at the end of the 19th century (Lander *et al.*, 2011). In site 1, the oldest tree is less than 150 year old. In site 2, most adults are less than 150 year old but there are two remnant trees which pre-date the recolonization.

At each study site, all the reproductive adult trees were mapped using a Trimble GPS (precision < 1 m), and their diameter at 1.3m above ground (dbh) was measured. A tree was considered to be reproductive when its diameter was greater than 10cm or when fruits were observed. Adult trees were often found in clusters of multiple stems due to root suckering or resprouting or because of germination of seeds from animal caches. In these cases the central point of the cluster was mapped, all stems were recorded and their diameters measured. In site 1, 187 individual trees or clusters (corresponding to 650 stems) were mapped (Table 1, Fig. 1). In site 2 we mapped 40 individual trees or clusters (corresponding to 55 stems) and 34 adults sampled in the neighborhood (< than 50 m away) were added to some analyses to increase sample size.

French National Forest Office records indicate that the last time *F.sylvatica* was logged at either site was before 1967. Site 1 was surveyed from 2006 until 2011 and site 2 from 1995 to 2007. No tree died during the 5 survey years at site 1. One tree died during the 12 survey years at site 2, but it was georeferenced and genotyped before dying. These figures converted into mortality rates of 0% (0-0.007%) per year in site 1 and 0.002% (0-0.07%) in site 2 (3 dead trees on average over 40 years). These low mortality rate are as expected for adult trees in recently established populations during a recolonisation phase.

In July 2007 we non-exhaustively sampled 256 seedlings (i.e. individuals < 1 m high) at site 1 and 355 seedlings at site 2 (Table 1, Fig. 1). All seedlings were mapped and their heights were measured. We classified the seedlings into two cohorts (young versus old) based on their size and architecture. In site 1,

the young cohort (110 seedlings) is made up of seedlings less than 1 year-old, identifiable because the cotyledons remain on the seedlings for the first year. The 137 old seedlings were estimated to be between 4 and 40 years old. Because a mast year occurred in 2006 on Mont-Ventoux, and no mast year was reported in 2004 and 2005, few 2- or 3-year old seedlings were expected. Very few seedlings of intermediate size were observed on both sites, reducing the risk of misclassification. On a subset of ~ 50 seedlings, leaf scars counts confirmed the visual classification criteria. On site 2, only 22 seedlings less than 1 year-old could be found. To have a balanced sampling design between cohorts, we therefore decided arbitrarily to split the seedlings in two cohorts based on their diameter D ($D_{\text{meanyoung}} = 5.20$ mm, $D_{\text{maxyoung}}=10$ mm, $D_{\text{meanold}}=32.02$ mm and $D_{\text{maxold}}= 91$ mm).

GENOTYPING AND CLASSICAL GENETIC ANALYSES

For each adult tree and seedling two leaves or buds were collected and stored at -20°C . DNA was isolated from buds or leaves using the Qiagen DNeasy Plant kit. All sampled individuals were genotyped at eleven microsatellite loci: FS1-15, FS3-04 (Pastorelli *et al.*, 2003); sfc0007-2, sfc-0018, sfc-0036, sfc-1063, sfc-1143, sfc-0161, sfc-1105 (Asuka *et al.*, 2004); mfc7, mfs-11 (Tanaka *et al.*, 1999). We used the original PCR conditions given by the authors. PCR products were separated on an automated 96-capillary MegaBACE™ 1000 sequencer (GE Healthcare). Genotypes were sized using the internal size standards ET400 and the MegaBACE™ Fragment Profiler ver. 1.2 software (GE Healthcare).

We checked for presence of null alleles in adults and seedlings using the maximum-likelihood method accounting for genotyping error implemented in ML-NullFreq (Kalinowski & Taper, 2006). We discarded one locus (mfs-11) because of high Null Allele Frequencies (mean NAF > 10%) in both populations and cohorts (Supplementary Table A1). Locus sfc-1063 also exhibited high NAF (mean NAF = 9%), but was kept in the analysis because patterns of NAF were less consistent across cohort (NAF < 5 % in adults).

We manually checked whether some individuals shared the same genotype (clones). In the adults, 22 clones (20 groups) were identified among the 187 adults at site 1 and 6 (3 groups) among the 74 adults at site 2. In the seedlings we identified 18 clones (9 pairs) at site 1 and 15 clones (9 groups) at site 2. For seedlings, a single representative of each clone was kept for all analyses (247 on site 1 and 346 on site 2, Table 1). For genetic analysis of the adults we used two different sets of individuals: for estimation of the classical population genetic parameters F_{IS} , allelic richness, and genetic diversity in FSTAT (Goudet, 2000), we included only a single representative of each clone group (167 and 71 individuals in sites 1 and 2 respectively). For the SEMM analyses we included all adult individuals within study site (187 and 40 individuals in site 1 and 2 respectively).

DISPERSAL ESTIMATES BASED ON SEMM

We used the SEMM (Burczyk *et al.*, 2006; Oddou-Muratorio & Klein, 2008) to estimate pollen and seed dispersal and male and female variations in fecundities. Consider N the set of all putative parents in the study site, and S the total number of sampled seedlings. A given seedling i may originate from (1) a mother tree outside the study site with probability m_s (immigrant seed), or (2) a mother tree inside the study site with probability $1-m_s$ (local seed). In this second case, the pollen grain that pollinated the mother tree could originate from (1) the mother tree with a probability s , (2) a father tree outside the study site with probability m_p (immigrant pollen), or (3) a father tree inside the study site with probability $1-s-m_p$ (local pollen).

The probability of observing the genotype G_i for the seedling i is thus:

$$P(G_i) = m_s T(G_i | BAF) + (1 - m_s) \sum_{j \in N} \Psi_{ij} \left[s T(G_i | M_j, M_j) + m_p T(G_i | M_j, BAF) + (1 - s - m_p) \sum_{k \in N} \Phi_{jk} T(G_i | M_j, F_k) \right]$$

(eq.1)

where $T(G_i/BAF)$ is the transition probability that an offspring coming from an immigrant seed has genotype G_i given a set of Background Allelic Frequencies (BAF). $T(G_i/M_j, M_j)$, $T(G_i/M_j, BAF)$, $T(G_i/M_j, F_k)$ are the transition probabilities that an offspring has genotype G_i when its mother of genotype M_j has been pollinated by (1) itself, (2) a father drawn at random from a population with allelic frequencies BAF , or (3) a father of genotype F_k .

Parameter Ψ_{ij} is the proportion of seeds from a mother j expected at the location of the seedling i among the virtual seed rain contributed by all sampled mothers, where τ_{ij} is a function of distance, elevation and fecundity (detailed below):

$$\Psi_{ij} = \frac{\tau_{ij}}{\sum_{l \in N} \tau_{il}} \quad (\text{eq.2})$$

Parameter Φ_{jk} is the proportion of pollen from a father k in the pollen pool of the mother j contributed by all sampled fathers, where π_{jk} is a function of distance and fecundity (detailed below):

$$\Phi_{jk} = \frac{\pi_{jk}}{\sum_{l \in N} \pi_{jl}} \quad (\text{eq.3})$$

Models for dispersal kernels: Two families of two-parameter distributions were used to model dispersal kernels: the exponential power distribution:

$$p_{ep}(a, b, r) = b/2 \cdot a^{-2} \cdot (2/b) \times \exp(-(r/a)^b) \quad (\text{eq. 4})$$

and Clark's 2Dt distribution (Clark *et al.*, 1999b):

$$p_{2Dt}(a, b, r) = (b-1)/a^2 \times (1+r^2/a^2)^{-b} \quad (\text{eq. 5})$$

Where a is a scale parameter homogeneous to a distance, b is a shape parameter affecting the tail of the dispersal kernel, and r is the mother-offspring or father-mother distance.

Both families of curves belonging to the exponential power and the 2Dt functions model a probability of dispersal decreasing with distance from the source tree but they differ in the way long-distance dispersal events are accounted for. In the exponential power function when $b > 1$ the function is thin tailed, with fewer long distance dispersal events than when $b < 1$ and the function is fat-tailed. By contrast, the 2Dt function is fat tailed whatever the values of a and b ($b > 1.5$ by definition). The 2Dt has been shown to more accurately represent the seed dispersal kernel in several studies (Clark *et al.*, 1999b; Greene *et al.*, 2004).

The parameters a and b are specific to each family of curves and cannot be directly compared; however the mean dispersal distance ($\bar{\delta}$) can be compared (Austerlitz *et al.*, 2004):

$$\bar{\delta}_{ep} = a^{1/b} (3/b)^{1/b} / (2/b) \quad (\text{eq. 6})$$

$$\delta_{2Dt} = a \frac{\Gamma(3/2) \Gamma(b-3/2)}{\Gamma(b-1)} \quad \text{for respectively } b > 3/2 \text{ and } b < 3/2 \text{ (eq. 7)}$$

$$\delta_{2Dt} = \infty$$

Models for selection gradients on female and male fecundity: The relative reproductive success τ_j of a female j at the location of seedling i was considered to be determined by three factors interacting multiplicatively: (1) the distance from seedling i to mother j through the seed dispersal kernel, (2) adult tree diameter D_j as a surrogate measure of female fecundity, (3) the difference in elevation between seedling i and mother j . This resulted in :

$$\tau_{ij} = p_s(a_s, b_s, r_{i_j}) \times D_j^{\rho_s} e^{v(alt_j - alt_i)} \quad (\text{eq. 8})$$

where p_s is the seed dispersal kernel (eq (4) and (5)), D_j is the diameter of mother j , alt_j and alt_i are the elevations of mother j and offspring i , and ρ_s and v are female fecundity parameters to be estimated.

We chose a power function of parameter ρ_s to model the selection gradient on tree diameter and an exponential function to relate differences in elevation and the reproduction success with parameter

v because (1) they are suitable for continuously distributed variables, and (2) they assure positive values for all parameter values.

Male fecundity (π_{jk}) was expressed as:

$$\pi_{jk} = p_p(a_p, b_p, r_{j_k}) \times D_{k^{p_p}} \quad (\text{eq. 9})$$

where D_k is the diameter of father k , p_p is the pollen dispersal kernel, and \mathbf{X}_p the male fecundity parameter to be estimated.

Maximum likelihood estimates :All parameters were estimated by maximising the log-likelihood of seedling genotypes. In each study site we fitted a single model for all seedlings (Model I), with the following log-likelihood function for the S seedlings :

$$\log L(\delta_p, b_p, \delta_s, b_s, s, m_p, m_s, \rho_p, \rho_s, v) = \sum_{i=1}^S \log[P(G_i)] \quad (\text{Model I, eq. 10})$$

with (δ_p, b_p) and (δ_s, b_s) the pollen and seed dispersal parameters, (s) the selfing rate, (m_p) and (m_s) the migration rates, $(\mathbf{X}_p, \mathbf{X}_s)$ the fecundity parameters and (\bullet) the elevation effect parameter. For numerical stability we estimated parameters δ_s and δ_p directly (see equation 6) rather than α_s and α_p .

We modelled different seed dispersal and seed migration parameters for young $(\delta_{sY}, b_{sY}, m_{sY})$ and old $(\delta_{sO}, b_{sO}, m_{sO})$ seedlings, but kept the pollen and fecundity parameters the same for both cohorts, using the following log-likelihood function :

$$\log L(\delta_p, b_p, \delta_{sY}, b_{sY}, \delta_{sO}, b_{sO}, s, m_p, m_{sY}, m_{sO}, \rho_p, \rho_s, v) = \sum_{i=1}^S \log[P(G_i)] \quad (\text{Model II, eq. 11})$$

Model fitting was achieved with a quasi-Newton algorithm in Mathematica 7 (Wolfram Research). The procedures for model selection are detailed in Online Appendix A1. Asymmetrical 95%-confidence intervals for the parameters from the best models were obtained by re-estimating the parameters based on 500 bootstrap datasets. Each bootstrap dataset was obtained by sampling seedlings (location and genotypes) with replacement until we reached the same numbers of seedlings in both cohorts as in the real data set.

EFFECT OF MORTALITY ON THE ESTIMATED DISPERSAL KERNEL

We ran simulations to investigate whether density-dependent mortality (DDM) occurring between seed dispersal and sampled seedling stages affects SEMM estimates of seed dispersal. We used a three-step procedure: (1) we simulated positions, diameters and genotypes for adult trees in a 200x200m plot and simulated seed rain in a 100x100m central plot according to known pollen and seed dispersal kernels (2) we simulated post-dispersal DDM and sampling among surviving seedlings and (3) we estimated the dispersal and fecundity parameters using the method applied to the *F.sylvatica* dataset (see section above).

The details of these computations are reported in Online Appendix A2. Briefly, in the simulations we generated on average 200 adults (density=50 trees/ha) and 3530 dispersed seeds (density=3530 seeds/ha). A proportion $m_s=0.3$ of the seeds resulted from unknown mothers outside the study site and were uniformly distributed in the sampling area. The remaining proportion $(1-m_s)$ of seeds were produced by the different known trees j with seed fecundities determined by their diameter D_j (average=15cm, SD=4cm) and parameter $\rho_s=1.5$ following eq 8. The locations of seeds resulting from tree j were randomly drawn from an exponential-power basic seed dispersal kernel (see eq. 4 and 6) with mean dispersal distance $\delta_s=10m$ and shape $b_s=0.5$. The fathers were drawn according to the relative contributions of all known trees and exterior pollen to the pollen pools (pollen migration rate $m_p=0.6$, pollen dispersal distance $\delta_p=75m$, shape $b_p=0.5$, effect of diameter on male fecundity $\rho_p=2$). Adult genotypes were drawn randomly and independently for 10 markers with 10 alleles each. Seed genotypes were drawn from their mother and father genotypes following Mendelian rules.

Three scenarios of Density Dependent Mortality (DDM) were applied to the seeds before sampling 500 surviving seedlings: 1) No DDM, 2) Low DDM, and 3) High DDM. In the first scenario, 500 seedlings were randomly sampled among all seeds (Fig. 2A). In the second and third scenarios, before randomly sampling 500 surviving seedlings, a number of seedlings died due to local competition. The level of competition experienced by each seedling was related to its distances from all adults following a Gaussian competition kernel (see eq. S4 and S5 in Online Appendix A2).

For each data set, the mating system and dispersal kernel parameters were estimated with the SEMM based on the genotypes and coordinates of the 500 sampled seedlings and the adults. We ran 100 simulations for each of the three mortality scenarios and we used them to compute the mean, median and confidence interval of the estimates of each parameter. We repeated the analysis with different resolutions of the genetic system (12x12, 10x10, 8x8 and 6x6 loci x alleles per locus) and different sampling intensities (300 or 500 seedlings). We also plotted the effective dispersal kernel, as the distribution of distance from mother to surviving offspring.

PARENTAGE ASSIGNMENTS AND EFFECTIVE DISPERSAL DISTANCE

Categorical parentage assignments were performed using a maximum-likelihood approach accounting both for incomplete sampling of the breeding population and for genotyping errors, and implemented in CERVUS (Marshall *et al.*, 1998). CERVUS allow the user to assign the parentage of an offspring to the pairs of parents (or the single parent) with the highest LOD-score at a chosen level of confidence (here 80%). The statistic used for this decision is Δ , the difference in LOD-score between the most likely parent pair (or single parent) and the second most likely parent pair (or single parent). The critical value (Δ_c) of Δ below which parentage cannot be attributed at the chosen level of statistical confidence is determined by simulations (here 10000 seedlings simulated). It has been shown that accounting simultaneously for both incomplete sampling of the breeding population and for genotyping errors can inflate the rate of non-assignment due to type II error (Oddou-Muratorio *et al.*, 2003). Therefore we used successively two strategies for parentage assignment. First we assumed incomplete sampling of the breeding population (at the rate m_s estimated by the SEMM within each site) and genotyping scoring error. In this case, we first tried to assign each offspring to the most-likely parent-pair; then for all the seedlings founding no compatible parent pairs, we ran a maternity analysis (parentage assignment to a single parent). Second, we assumed complete sampling of the breeding population and a genotyping error rate of 0.01%. In this case, we assigned each offspring to the most-likely parent-pair, but kept only the assignments with maximum 3 mismatches between the

seedling and parent pair's genotypes. Because many seedlings found a compatible parent pairs when accounting for genotyping error, maternity analyses were skipped.

For each site and each strategy, we computed the effective seed dispersal distance as the distance between the seedlings and (1) the nearer of the two assigned parent when a pairs of parent was assigned or (2) the single assigned parent. The distributions of effective distance between young and old cohorts were compared by a classical ANOVA model using R.

Results

SENSITIVITY OF SEMM TO DENSITY-DEPENDENT MORTALITY

The simulations showed that density-dependent mortality (DDM) mimicking the Janzen-Connell (JC) process did not affect SEMM estimates of the seed dispersal kernel but strongly affected estimates of the seed migration rate (Table 2). From scenario LowDDM to HighDDM the intensity of mortality due to competition increased from 79.4% to 94.4% (Fig. 2 B-C). As expected after DDM, the effective dispersal kernel of the simulated samples turned from an L-shaped distribution to more hump-shaped functions (Fig. 2D) and the average dispersal distance increased (NoDDM: 10.0m, LowDDM: 15.0, HighDDM: 20.8m). Nevertheless; for all mortality scenarios the distribution of the estimated mean dispersal distances of pollen and seed (δ_p and δ_s) and of the estimated shape dispersal parameters (b_p and b_s) was centred on and always included the true value.

Overall, the estimate of average seed dispersal distance (δ_s) had no bias (as depicted by the mean of δ_s distribution) and high precision (as depicted by the quantiles of δ_s distribution) whatever the mortality scenario in the basic case with 10 markers with 10 alleles and 500 seedlings (Table 2). The precision was lower for scenarios with low and high DDM. This was due to under-representation of short seed dispersal

distances in DDM scenarios which resulted in greater instability for the fit of the seed dispersal kernel, and high δ_S -values in some simulations. For lower numbers of markers/allele or lower seedling sampling sizes the δ_S estimate remained unbiased but its precision tended to decrease (Fig. 3).

In contrast to δ_S , the seed migration rate estimate (m_S) was sensitive to DDM. In the noDDM scenario, the estimated m_S -value did not differ from the true value (=30%). However in the lowDDM and highDDM scenarios the estimated m_S -values were much higher ($m_S=46\%$ on average for lowDDM and $m_S=56\%$ on average for highDDM scenarios). This was because local seedlings occur more often close to an adult tree (their mother) whereas migrants are uniformly distributed. Therefore, local seedlings have on average higher mortality in the lowDDM and highDDM than do migrant seedlings.

Other parameters such as the pollen migration rate (m_P) and the selection gradients of diameter (χ_S and χ_P) were not affected by DDM and were estimated with no bias and high precision in all scenarios. In contrast the estimate of pollen dispersal distance (δ_P) was biased and this bias increased for scenarios with low and high DDM (NoDDM: mean $\delta_P = \text{true}\delta_P + 5\text{m}$, low/high DDM : mean $\delta_P - \text{true}\delta_P > 10^5$). The pollen dispersal parameters can be difficult to estimate in the SEMM applied to seedlings because the quality of the fit depends on the number of seedlings having both local male and female parents (full local seedlings). When the number of full local seedlings become too low, typically because of a high pollen migration rate ($m_P = 60\%$) and high seed migration rate (m_S was up to 46% and 56% in the low and high DDM scenarios), the fit of the pollen dispersal kernel becomes unstable, with some simulations producing unrealistically high δ_P -values (as can also be seen from the quantile of the distribution). The median of the δ_P estimate was more satisfactory because less it was less sensitive to high δ_P -values (random mortality: med $\delta_P = \text{true}\delta_P - 7\text{m}$, low DDM: med $\delta_P = \text{true}\delta_P - 0.5\text{m}$, highDDM: med $\delta_P = \text{true}\delta_P - 7\text{m}$).

SEMM ESTIMATES OF DISPERSAL PATTERNS IN FAGUS SYLVATICA.

For the 10 microsatellite markers used in this study we had between 4 and 17 sampled alleles/locus, with 11.8 alleles/locus on average across loci and cohorts (Online Table S1). Due to moderate levels of Nei's genetic diversity ($H_e = 0.67$ across loci and cohorts), the effective number of allele/locus ranged between 1.5 and 5.4 (3.8 on average). F_{IS} values were not significantly different from zero whatever the locus, cohort or site. Average Null Allele Frequencies were 2.4% for site 1 and 1.5% for site 2. The average probabilities of false exclusion of sampled adults due to null alleles were estimated to be 8% in site 1 and 6% in site 2 (Online Appendix A3).

At both sites, the SEMM providing the best fits were the complete models, including (1) two-parameter dispersal kernels for pollen and seeds; (2) the impact of diameter on male and female fecundity and (3) the effect of elevation difference on female fecundity (Table 3, Online Appendix A1). Two-cohort models (Model II) also led to a significantly better fit than single-cohort models (Model I), the effect being much more important at site 2 (Table 3; site 1: $p\text{-val} = 0.006$, site 2: $p\text{-val} < 10^{-3}$). This means that accounting for differences in dispersal abilities among the adult trees that generated the young and old cohorts (dispersal kernel and/or migration rate) significantly improved the model.

We compared the goodness of fit of Model I and sub-Model II where only parameters of the seed dispersal kernel (and not the migration rate) varied among cohorts (model 7 in Online Appendix A1). At site 1, the LRT test was significant ($p\text{-value} = 0.05$), showing that the difference in dispersal kernels among cohorts contributed significantly to the increase in likelihood between Model I and Model II. However, the confidence intervals around the dispersal parameters overlapped between the young and old cohorts. The estimated distance of seed dispersal tended to be lower for the young cohort ($\delta_{SY} = 11.87\text{m}$ [8.16;36.9] versus $\delta_{SO} = 21.63\text{m}$ [8.19;>1000]). The tail of the seed dispersal kernel (modelled with an exponential power function) tended to be fatter for the old cohort ($b_{SO} = 0.2$ [0.01;0.46] versus $b_{SY} = 0.79$ [0.16;2.42]). To model pollen dispersal we selected the exponential power function, and estimated $\delta_p = 48.18\text{m}$ [23.06;186.77] and $b_p = 0.54$ [0.23;2.03]); the kernel was significantly fat-tailed (Online Appendix A1).

At site 2, sub-Model II, where only seed dispersal kernels varied among cohorts, brought no significant increase in the likelihood compared to Model I (Online Appendix A1), showing that differences between dispersal kernels among cohorts were not significant. The tail of the seed dispersal kernel (modelled with a 2Dt function) tended to be fat-tailed ($b_{sy}=1.57$ [1.11;4.27], $b_{so}=2.14$ [1.58;4.08]), but was not significantly different from an exponential function (Online Appendix A1). The confidence intervals around average seed dispersal distances were large in particular for the young cohort ($\underline{l}_{sy}= 47.57\text{m}$ [0,>1000], $\underline{l}_{so}= 4.51\text{m}$ [0;16.2]). This was due to low b_s -value, leading to high δ_s -values in some bootstrapped data sets. To model pollen dispersal we selected the exponential power function, and estimated $\underline{l}_p=15.73\text{m}$ [9.9;112.25], and $b_p= 1.46$ [0.44;4.50].

Estimated migration rates were high at both sites and for both seed and pollen. Sub-model II where only the migration rate (and not the dispersal kernel) varied between cohorts, showed significant differences between cohorts, especially at site 2 (site1 : p-value=0.01, site 2 : p-value<10⁻³; models 8 in online Table A2). At both sites the seed migration rate was significantly lower for the young cohort (site 1 : $m_{sy}= 0.12$ [0.04; 0.2]; site 2 : $m_{sy}= 0.2$ [0.13;0.27]) than for the old cohort (site 1 : $m_{so}=0.33$ [0.25;0.42]; site 2 $m_{so}=0.72$ [0.64;0.79]). We also found important pollen migration rates $m_p = 0.6$ and 0.62 for site 1 and 2 respectively.

Including diameter as a proxy of male and female fecundity led to significantly better fits at both sites. The gain in likelihood was more important at site 1 (site 1, pval<10⁻³, site 2, pval = 0.0002). At site 1 the mean diameter was the best proxy of male and female fecundity while total diameter was the best proxy at site 2. We also found a significant effect of difference in elevation (v parameter, Table 3) on female fecundity, the sign of this effect depending on the site. At site 2 we estimated $v = 0.05$ [0.02;0.09], meaning that trees dispersed more seedlings downslope which is consistent with the expected effect of gravity. At site 1 by contrast, we estimated $v = -0.03$ [-0.05,-0.02], meaning that adult trees dispersed more seedlings upslope. This may be due to abiotic factors such as wind or directed dispersers behaviour.

EFFECTIVE SEED DISPERSAL IN FAGUS SYLVATICA.

At both sites, the average effective seed dispersal distance was lower for young versus old seedlings, whatever the strategy used to assign parentage (Table 4). At site 1, it increased from ~33m to 48 m, whereas at site 2 it increased from ~23m to 33m. The lower effective distance observed at site 2 as compared to site 1 is likely to result from the smaller area of site 2, and reveals the sensitivity of these effective estimate to sampling design.

Discussion

SEED DISPERSAL KERNEL ESTIMATED FROM ESTABLISHED SEEDLINGS : DDM DOES NOT MATTER

We demonstrated that seed dispersal kernels estimated using SEMM on established seedlings are not sensitive to density-dependent mortality (DDM) during the recruitment process. This means that SEMM estimate the basic seed dispersal kernel, encompassing only movement of the dispersed seed, and not the effective dispersal kernel, encompassing additionally the “post-arrival” survival of seeds (Nathan *et al.*, in press). The simulation results show that SEMM provides dispersal parameters estimates that are very close to the basic dispersal kernel whatever the pattern and the strength of simulated DDM (Table 2). This contradicts the idea which seems to be widely accepted in the literature that analyses of seedling data always provide effective dispersal kernels.

We chose here to model DDM driven by the distance to all neighbouring adults, which allowed us simulate the well-known Janzen-Connell (JC) hump-shaped recruitment function as shown by the increase in average effective seed dispersal distance (Fig. 2D). We could have obtained similar JC like patterns by modelling DDM as driven by the seedlings density in the neighbourhood or by other species-specific processes, or we could have simulated other patterns of recruitment driven by DDM (McCanny 1985). However it was out of

the scope of this study to investigate all the possible DDM and recruitment scenarios and their impact on SEMM estimates, though such specific simulation study could be useful in the future.

Moreover, the insensitivity to DDM of SEMM estimates demonstrated in this study is likely to be true in any recruitment pattern where mortality does not depend on seedling genotype but only on seedling density, distance to the adult trees, and environmental variables. This was expected from a mathematical point of view because the SEMM analyses the seed pool composition given by Eq (2) and not seed rain intensity.

Accounting for a local mortality rate $Mort$ at sampling location would result in:

$$\Psi_{ij} = \frac{\tau_{ij} \times Mort_i}{\sum_{l \in N} \tau_{il} \times Mort_i} = \frac{\tau_{ij}}{\sum_{l \in N} \tau_{il}},$$

Which simplifies into former Eq (2) under the assumption that the mortality rate does not depend on the seed origin but only on location (i.e. is not dependent on j and l but is dependent on i). This does not mean we assume that mortality is independent of genotype or origin at a large spatial scale. Progeny of mother trees in dense areas are likely to suffer more from DDM, but at any given location mortality will affect equally the seeds received from all mother trees. Note that the assumption becomes erroneous in a hypothetical case where two classes of seedlings co-occur that are differentially susceptible to DDM. The insensitivity to DDM of SEMM is a useful property, in addition to other properties already demonstrated by Robledo-Arnuncio and Garcia (2007), in particular the insensitivity of SEMM to the sampling design.

While the SEMM estimate of the seed dispersal kernel is not affected by DDM, our simulations showed the opposite result for seed migration rates (m_s). We found a strong increase in effective seed migration rates in populations undergoing Janzen-Connell (J-C) like DDM (from 30% to 46% in our simulations with high DDM). This was due to lower mortality among randomly-distributed migrants relative to local seedlings clustered near trees in our simulations. Such difference in the DDM pressure among migrant and local seedlings is likely to be lower in natural populations, particularly for species where animal assisted dispersal (e.g. fleshy fruit species) can lead to the clumping of migrant seedlings (e.g. beneath other fruiting trees or roost trees,

(Jordano *et al.*, 2007)). Caution should therefore be exercised in interpreting patterns of variation in the seed migration rate as result of DDM.

THE BASIC SEED DISPERSAL KERNEL VARIED AMONG COHORTS IN *F. SYLVATICA*

SEEM estimates of dispersal kernels differed significantly between young and old cohorts only at site 1, where seeds of the old cohort were dispersed farther away from the mother tree ($\delta_{so}=21.7\text{m}$, $b_{so}=0.2$) than seeds from the young cohort ($\delta_{sy}=11.9\text{m}$, $b_{sy}=0.79$). These differences in the basic dispersal kernel may result from between-year variability in ecological factors such as wind conditions, phenology of seed maturity, and total seed set. Interestingly, young cohort at site 1 is made from even-aged seedlings (less than 1 year old), whereas other cohorts are made from uneven-aged seedlings. Our result suggest that estimates based on only few or a single dispersal event (the young cohort at site 1) will be particularly sensitive to ecological conditions, as compared to more average estimates based on several dispersal events (the old cohorts). Annual fluctuation in the dispersal process may contribute to the general annual variation in the recruitment process, and clearly need to be considered in ecological studies together with spatial variation (Beckage *et al.*, 2005). Regarding variation in the seed dispersal kernel in *F.sylvatica*, the shape and scale of the seed dispersal kernel were found to be rather similar across 7 plots in 4 different forests across Europe (Chybicki *et al.* pers comm.). Such low variation may reflect morphological and physiological constraints on dispersal within species. But it may also result from the fact that estimated dispersal kernels do not account for long distance dispersal which is the component of dispersal that is the most stochastic (Nathan *et al.*, in press).

BASIC AND EFFECTIVE DISPERSAL PATTERNS DIFFER IN *F.SYLVATICA*

Life-stage studies are commonly used to investigate patterns of DDM from the difference in dispersal patterns among cohorts of established seedlings, attributed to mortality processes over time (Amm *et al.*, in press; Augspurger, 1983). As expected, the average effective seed dispersal distance was found in this study to increase significantly between young and old cohorts from ~33m to 48 m at site 1 and from ~23m to 33m at site 2 (Table 4). However, when different cohorts are compared, differences in the initial seed dispersal patterns from which each cohort originates may contribute to differences in effective dispersal patterns among cohorts. In line with the study of Steinitz *et al.* (2011), we propose an original two-step procedure to investigate jointly dispersal and DDM based on genetic and spatial data, which involves using SEMM to estimate basic seed dispersal kernels and raw parentage analyses to estimate effective dispersal in each seedling cohort, and then comparing basic and effective estimates of dispersal for the seedling cohorts. The added value of this strategy was clear in the case study in *F. sylvatica*. Because basic dispersal kernels differed between the young and the old cohort at site 1 ($\delta_{SO}=21.7\text{m}$, $b_{SO}=0.2$ versus $\delta_{SY}=11.9\text{m}$, $b_{SY}=0.79$), we cannot rule out that the observed differences between effective dispersal distances ($\text{dist}_O \sim 48\text{m}$ versus $\text{dist}_O \sim 33\text{m}$) were partly due to differences in the initial seed dispersal patterns. By contrast at site 2, where basic dispersal kernels were similar, the shift in effective dispersal patterns across cohorts are likely to result from DDM. Note that the fact that young and old cohorts at site 2 were defined based on differences in diameter rather than age does not undermine the strength of our result. Even if the correlation between age and diameter was shown to be poor (which does not seem the case in *F. sylvatica* based on a subsample of seedlings), the biggest a seedling, the less likely it is to suffer competition and DDM. Because young and old seedlings were distributed all over the plot at site 2 (Online Appendix A4), we can thus assume that both their size (diameter) and their age are positively correlated with the cumulated risk of mortality they suffered. Results at site 2 thus clearly suggest a shift in effective dispersal distance for seedlings surviving mortality.

Migration rates also strongly increased between the young and the old cohort at both sites (from 12% to 33% at site 1 and from 20 to 72% at site2), consistent with the expected effect of J-C like DDM found in our

simulations. The other (nonexclusive) hypothesis to explain this increase in migration rate are (1) difference in “basic” seed dispersal rate, for instance higher seed migration rate for old versus young seedlings in site 1, in line with the higher δ_s estimate; and (2) higher migration rates in the past, in line with the recolonisation history. Though we cannot estimate past migration rate, we can be confident that the high migration rate observed in the old seedlings is not due to adult mortality, which is negligible in our sites.

Overall our results thus suggest significant effect of DDM on the spatial structure of seedlings in particular at site 2, in line with several indirect evidence of JC mortality in *F. sylvatica* on Mt Ventoux. First, *F. sylvatica* seedlings are known to suffer heavy competition when they occur near adult conspecifics (Nilsson, 1985). We also have independent evidence of JC mortality at site 2 based on a previous study (Sagnard *et al.*, 2007). Also in both study sites the average distance to the nearest adult tree was significantly higher (at the 95% confidence level) for the old cohort (10.3m at site 1 and 12.1 at site 2) than for the young cohort (8.5m at site 1 and 9.0 at site 2). Finally, the shift in effective dispersal distances observed *F. sylvatica* at site 1 (in a factor 1 to 1.5) and site 2 (in a factor 1 to 1.4) were similar to those simulated under low DDM (in a factor 1.5) and lower than those simulated under high DDM (in a factor 2). However, additional spatial analyses would be required to investigate whether low DDM driven by the distance to neighboring adult following a Gaussian competition kernel explain the shift in seedling spatial distributions observed in *F. sylvatica*.

To summarize, this study highlights the interest of life-stage approaches to decipher the respective roles of dispersal and mortality on spatial patterns of regeneration, and the need to carefully distinguish and estimate basic and effective patterns of dispersal. Basic estimate of dispersal do not include DDM even if they are inferred from established seedlings, as we demonstrated here in the case of seed dispersal kernel estimated through SEMM. By contrast, effective estimate of dispersal include both the effects of basic dispersal and DMM, and these effects can be separated by comparing basic and effective dispersal estimates.

Acknowledgements:

We are grateful to Tonya Lander, Arndt Hampe and Annabelle Amm for comments on a previous version of this manuscript. We thank Norbert Turion, Olivier Gilg, Frank Rei and Frédéric Jean for field work (mapping, sample and measurements). We thank Anne Roig, Bruno Jouaud and Matthieu Lingrand for genotyping and managing the lab work. This study was funded by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR ColonSGS; grant ANR-07-JCJC-0117), the EC-supported Network of Excellence Evoltree (GOCE-016322, BEECH initiative) and the French program ECOGER.

References

- Adams, W.T., Griffin, A.R., & Moran, G.F. (1992) Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant populations. *The American Naturalist*, **140**, 762-780.
- Alvarez-Buylla, E.R., Chaos, A., Pinero, D., & Garay, A.A. (1996) Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal and seed banks. *Evolution*, **50**, 1155-1166.
- Amm, A., Pichot, C., Dreyfus, P., & Davi, H. (in press) Improving the estimation of landscape scale seed dispersal by integrating seedling recruitment. *Annals of Forest Science*, doi [10.1007/s13595-012-0208-1](https://doi.org/10.1007/s13595-012-0208-1).
- Asuka, Y., Tani, N., Tsumura, Y., & Tomaru, N. (2004) Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 101-103.
- Augspurger, C. (1983) Phenology, flowering synchrony, and fruit set of six neotropical shrubs. *Biotropica*, **15**, 257-267.
- Austerlitz, F., Dick, C., Dutech, C., Klein, E., Oddou-Muratorio, S., Smouse, P., & Sork, V. (2004) Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Mol Ecol*, **13**, 937 - 954.
- Beckage, B., Lavine, M., & Clark, J.S. (2005) Survival of tree seedlings across space and time: estimates from long-term count data. *Journal of Ecology*, **93**, 1177-1184.
- Burczyk, J., Adams, W.T., Birkes, D.S., & Chybicki, I.J. (2006) Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. *Genetics*, **173**, 363-372.
- Clark, J.S., Beckage, B., Camill, P., Cleveland, B., HilleRisLambers, J., Lichten, J., McLachlan, J., Mohan, J., & Wyckoff, P. (1999a) Interpreting recruitment limitation in forests. *Am. J. Bot.*, **86**, 1-16.
- Clark, J.S., Silman, M., Kern, R., Macklin, E., & HilleRisLambers, J. (1999b) Seed dispersal near and far: patterns across temperate and tropical forests. *Ecology*, **80**, 1475-1494.
- Gonzalez-Martinez, S.C., Burczyk, J., Nathan, R., Nanos, N., Gil, L., & Alia, R. (2006) Effective gene dispersal and female reproductive success in Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Aiton). *Molecular Ecology*, **15**, 4577-4588.

- Goudet, J. (2000) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.1). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Greene, D.F., Canham, C.D., Coates, K.D., & Lepage, P.T. (2004) An evaluation of alternative dispersal functions for trees. *Journal of Ecology*, **92**, 758-766.
- Hampe, A., El Masri, L., & Petit, R.J. (2010) Origin of spatial genetic structure in an expanding oak population. *Molecular Ecology*, **19**, 459-471.
- Hille Ris Lambers, J., Clark, J.S., & Beckage, B. (2002) Density-dependent mortality and the latitudinal gradient in species diversity. **417**, 732-735.
- Hubbell, S.P. (1980) Seed Predation and the Coexistence of Tree Species in Tropical Forests. *Oikos*, **35**, 214-229.
- Jones, F.A. & Hubbell, S.P. (2006) Demographic spatial genetic structure of the Neotropical tree, *Jacaranda copaia*. *Molecular Ecology*, **15**, 3205-3217.
- Jordano, P., Garcia, C., Godoy, J.A., & Garcia-Castano, J.L. (2007) Differential contribution of frugivores to complex seed dispersal patterns. *PNAS*, **104**, 3278-3282.
- Kalinowski, S. & Taper, M. (2006) Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, **7**, 991-995.
- Klein, E.K. & Oddou-Muratorio, S. (2011) Pollen and seed dispersal inferred from seedling genotypes: the Bayesian revolution has passed here too. *Molecular Ecology*, **20**, 1077-1079.
- Kunstler, G., Thuiller, W., Curt, T., Bouchaud, M., Jouvie, R., Deruette, F., & Lepart, J. (2007) *Fagus sylvatica* L. recruitment across a fragmented Mediterranean Landscape, importance of long distance effective dispersal, abiotic conditions and biotic interactions. *Diversity and Distributions*, **13**, 799-807.
- Lander, T.A., Oddou-Muratorio, S., Prouillet-Leplat, H., & Klein, E.K. (2011) Reconstruction of a beech population bottleneck history using archival demographic information and Bayesian analysis of genetic data. *Molecular Ecology*, **20**, 5182-5196.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., & Pemberton, J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**, 639-655.
- Martin, P.H. & Canham, C.D. (2010) Dispersal and recruitment limitation in native versus exotic tree species: life-history strategies and Janzen-Connell effects. *Oikos*, **119**, 807-824.
- McCanny, S. (1985) Alternatives in Parent-Offspring Relationships in Plants. *Oikos*, **45**, 148-149.
- Moran, E.V. & Clark, J.S. (2011) Estimating seed and pollen movement in a monoecious plant: a hierarchical Bayesian approach integrating genetic and ecological data. *Molecular Ecology*, **20**, 1248-1262.
- Nathan, R., Klein, E.K., Robledo-Arnuncio, J.J., & Revilla, E. (in press). Dispersal kernels. In *Dispersal and Spatial Evolutionary Ecology* (eds J. Clobert, M. Baguette, T.G. Benton & J.M. Bullock).
- Nathan, R. & Muller-Landau, H. (2000) Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 278-285.
- Nilsson, S.G. (1985) Ecological and Evolutionary Interactions between Reproduction of Beech *Fagus sylvatica* and Seed Eating Animals. *Oikos*, **44**, 157-164.
- Oddou-Muratorio, S., Houot, M.-I., Demesure-Musch, B., & Austerlitz, F. (2003) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Molecular Ecology*, **12**, 3427-3439.

- Oddou-Muratorio, S. & Klein, E.K. (2008) Comparing direct vs. indirect estimates of gene flow within a population of a scattered tree species. *Molecular Ecology*, **17**, 2743-2754.
- Pastorelli, R., Smulders, M.J.M., Van't Westende, W.P.C., Vosman, B., Giannini, R., Vettori, C., & Vendramin, G.G. (2003) Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 76–78.
- R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing), Vienna, Austria.
- Ribbens, E., Silander, J.A., & Pacala, S.W. (1994) Seedlings recruitment in forests: calibrating models to predict patterns of tree seedlings dispersal. *Ecology*, **75**, 1794-1806.
- Robledo-Arnuncio, J.J. & Garcia, C. (2007) Estimation of the seed dispersal kernel from exact identification of source plants. *Molecular Ecology*, **16**, 5098-5109.
- Sagnard, F., Pichot, C., Dreyfus, P., Jordano, P., & Fady, B. (2007) Modelling seed dispersal to predict seedling recruitment: Recolonization dynamics in a plantation forest. *Ecological Modelling*, **203**, 464-474.
- Steinitz, O., Troupin, D., Vendramin, G.G., & Nathan, R. (2011) Genetic evidence for a Janzen-Connell recruitment pattern in reproductive offspring of *Pinus halepensis* trees. *Molecular Ecology*, **20**, 4152-4164.
- Tanaka, K., Tsumura, Y., & Nakamura, T. (1999) Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F. japonica*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 11-15.

Figure legend

Fig.1 : Sampling design for site 1 (a) and site 2 (b) with location of adult *F.sylvatica* trees () and seedlings(x). Lines are for elevation level. Size of full circles is proportional to the mean diameter of the cluster while size of the empty circles is proportional to the total diameter.

Fig. 2 : Simulation design for the 500 seedlings used to estimate seed dispersal kernel under three levels of density-dependent mortality (NoDDM = Random mortality ; LowDDM= Low density-dependent mortality ; HighDDM = high density-dependent mortality). A-C: Sampling design of simulated seedlings (green crosses) and their parent trees (black dot, with dot size proportional to diameter) for scenarios NoDDM (A), LowDDM (B) and HighDDM (C). D: Distributions of post mortality mother-seedling dispersal distances (i.e. effective kernels) for scenarios NoDDM (full line), LowDDM (long dash) and HighDDM (short dash). The three levels of mortality resulted in average dispersal distances equal to 10.1m (No DDM), 15.0 (Low DDM) and 20.8m (High DDM).

Fig. 3: Performance of the estimates of the mean seed dispersal distance under several marker resolutions or sampling intensities for the three levels of density-dependent mortality (NoDDM = Random mortality ; LowDDM= Low density-dependent mortality ; HighDDM = high density-dependent mortality). We plotted the median of the estimates of δ_s -values obtained from 100 simulations runs under different genetic systems (x-axis: number of loci x number of alleles per locus) and two sample sizes (for 10 loci and 10 alleles per locus, we used 500 (default) or 300 sampled seedlings (last group of bars)).

Table 1 Study sites and sampling design. Besides the total number of adult stems (N_A) we give in brackets the adult sample size when keeping only a single representative of each clone. In site 2, 34 adults close to the study site were added to increase sample size (*). The number of young (N_Y) and old (N_O) seedlings include only non-clonal individuals.

Site	Elevation (m)	Area (ha)	Coordinates (UTM)		N_A	N_Y	N_O
1	1100	4	44°10'45"N	5°14'01"E	187 (167)	110	137
2	1450	2.7	44°11'03"N	5°16'57"E	40 +34* (71)	131	215

Table 2 Mating and dispersal parameters estimated with the SEMM from simulated seedlings that survived to different levels of Density-Dependent Mortality (DDM). For each of three mortality scenarios (no, low or high-DDM) we estimated the mating and dispersal parameters for 100 simulations with 500 seedlings sampled in each. We report the mean, median and quantiles at 2.5% ($q_{2.5}$) and 97.5% ($q_{97.5}$) over the 100 simulations for each parameter: average dispersal distance (δ_s, δ_p), shape of dispersal kernel (b_s, b_p), migration rates (m_s, m_p), selfing rate (s), selection gradient for diameter (ρ_s, ρ_p).

Scenario	Param.	δ_s	b_s	m_s	δ_p	b_p	m_p	ρ_s	ρ_p
	True value	10.0	0.50	0.30	75.0	0.50	0.60	1.5	2.0
No DDM	Mean	10.1	0.49	0.30	81.8	0.54	0.60	1.5	2.0
	Median	10.1	0.50	0.30	68.0	0.55	0.60	1.5	2.0
	$q_{2.5}$	8.9	0.41	0.27	51.5	0.33	0.56	0.9	1.5
	$q_{97.5}$	11.4	0.59	0.33	135.6	0.81	0.64	2.1	2.5
Low DDM	Mean	10.2	0.50	0.46	>10 ⁵	0.53	0.60	1.6	2.1
	Median	10.2	0.50	0.45	74.5	0.52	0.60	1.6	2.1
	$q_{2.5}$	8.4	0.38	0.40	47.4	0.20	0.55	0.8	1.4
	$q_{97.5}$	11.8	0.64	0.54	332.7	0.91	0.65	2.4	2.7
High DDM	Mean	10.1	0.56	0.58	>10 ⁵	0.58	0.60	1.5	2.1
	Median	9.9	0.52	0.58	68.1	0.52	0.60	1.5	2.1
	$q_{2.5}$	7.1	0,36	0,50	42,9	0,23	0,53	0,3	1,4
	$q_{97.5}$	14.5	0,92	0,65	227,9	1,15	0,67	2,7	2,9

Table 3 Estimates of dispersal parameters, mating system and selection gradients for *Fagus sylvatica* on each site. We estimated the mating and dispersal parameters using successively a single-cohort model (model I) and a two-cohort model (model II) where only the seed dispersal parameters were allowed to vary among young and old seedling cohort. For each model we report the log-likelihood of the data set (L), the number n of parameters in the model, and estimates of : average dispersal distance (δ_p, δ_s), shape of dispersal kernel (b_p, b_s), migration rates (m_p, m_s), selfing rate (s), selection gradient for diameter (ρ_p, ρ_s) and difference in parent-offspring elevation (v), with their 95%-confidence intervals (CI).

Site 1*

Model	<i>L</i>	<i>n</i>	Value	δ_P	b_P	m_P	<i>s</i>	δ_S/δ_{S_Y}	b_S/b_{S_Y}	m_S/m_{S_Y}	δ_{S_o}	b_{S_o}	m_{S_o}	ρ_P	ρ_S	ν
Single-	-5160.95	10	estimate	72.17	0.39	0.59	0.01	16.76	0.31	0.23	-	-	-	1.4	3.73	-0.04
cohort			CI -	23.45	0.25	0.52	-	10.16	0.08	0.17				0.24	3.11	-0.05
(I)			CI +	167.35	1.9	0.68	-	55.35	0.56	0.3				2.33	4.51	-0.02
Two-	-5149.38	13	estimate	48.18	0.54	0.6	0.01	11.87	0.79	0.12	21.63	0.2	0.33	1.38	3.74	-0.03
cohort			CI -	22.84	0.23	0.52	-	8.16	0.16	0.04	8.19	0.01	0.25	0.2	3.08	-0.05
(II)			CI +	186.77	2.03	0.68	-	36.9	2.42	0.2	>1000	0.46	0.42	2.37	4.49	-0.02

* fits were achieved using an exponential power kernel both for pollen and seed dispersal. The selfing rate was fixed to 0.01 to optimise convergence.

Site 2*

Model	<i>L</i>	<i>n</i>	Value	δ_P	b_P	m_P	<i>s</i>	δ_S/δ_{S_Y}	b_S/b_{S_Y}	m_S/m_{S_Y}	δ_{S_o}	b_{S_o}	m_{S_o}	ρ_P	ρ_S	ν
I	-7690.88	10	estimate	15.67	1.48	0.63	0.04	19.50	1.57	0.52	-	-	-	0.23	0.83	0.05
			CI -	9.85	0.52	0.54	0.01	0	1.26	0.47				-0.04	0.51	0.03
			CI +	82.4	3.24	0.7	0.07	53.86	2.78	0.57				0.57	1.16	0.09
II	-7654.43	13	estimate	15.73	1.46	0.62	0.04	47.57	1.57	0.2	4.51	2.14	0.72	0.24	0.81	0.05
			CI -	9.9	0.44	0.54	0.01	0	1.11	0.13	0	1.58	0.64	-0.03	0.54	0.02
			CI +	112.25	4.50	0.70	0.07	>1000	4.27	0.27	16.2	4.08	0.79	0.57	1.09	0.09

*fits were achieved using a 2Dt to model seed dispersal and an exponential power kernel to model pollen dispersal.

Table 4 : Effective seed dispersal distance inferred from categorical parentage analyses. On each site two strategies of parentage assignment were applied, assuming either incomplete sampling of the parent population (of size NP) at a rate S and no genotyping error or complete sampling of the parent population but a genotyping error rate (Error). We report for each case the critical value for parentage (Δ_{C-PP}) or for maternity (Δ_{C-M}) assignment, the number of seedlings successfully assigned to a parent pairs (N_{PP}) or to a mother parent (N_M), the average seed dispersal distance for young ($Dist_Y$) and old ($Dist_O$) cohorts, and the p-value of the ANOVA test for the difference between $Dist_Y$ and $Dist_O$.

Site	Strategy for parentage analyses					Results				
	N_P	S(%)	Error(%)	Δ_{C-PP}	Δ_{C-M}	N_{PP}	N_M	$Dist_Y(m)$	$Dist_O(m)$	p-value
1	167	77	0	0	0.25	74	129	31.63	49.26	0.002
1	167	100	1	0	-	233	-	34.2	47.07	0.007
2	71	60	0	0	0.95	25	84	25.08	34.84	0.02
2	71	100	1	0	-	142	-	21.46	30.87	0.0096

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Online Appendix A1: Spatially explicit Mating Model (SEMM) selection for the estimation of dispersal parameters and heterogeneity in reproductive success in *Fagus sylvatica*.

Online Appendix A2. Detailed description of simulations performed in section “Effect of density-dependent mortality on the estimated dispersal kernel”

Online Appendix A3. Computation of the probability of falsely excluding an offspring because of null alleles

Online Appendix A4. Spatial distribution of young and old seedlings at each site.

Online Table S1: Number of alleles sampled (N_a), Nei's genetic diversity (H_e), number of effective alleles, inbreeding coefficient (F_{is}) and null allele frequencies (NAF) values for each marker and each cohort.

Figure 1a)

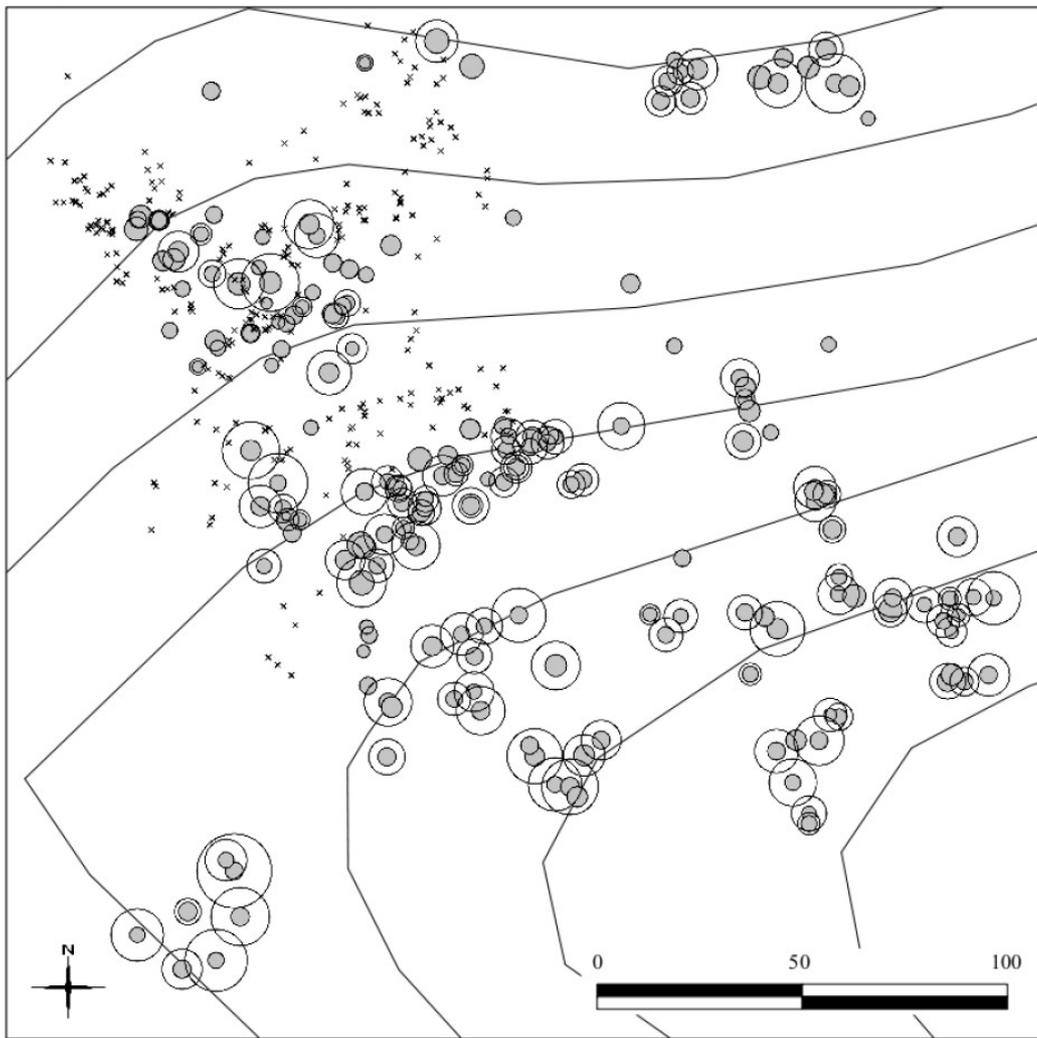


Figure 1 b)

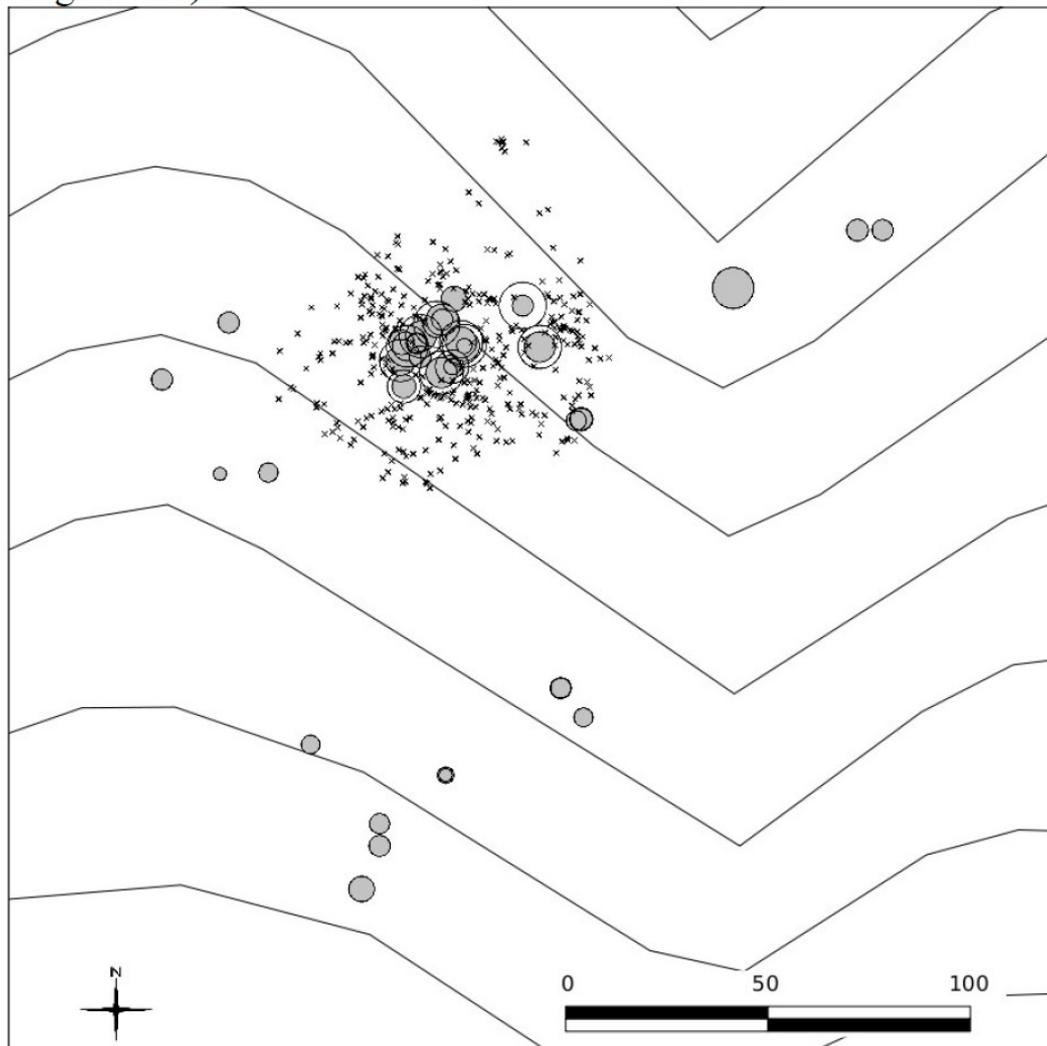


Figure 2

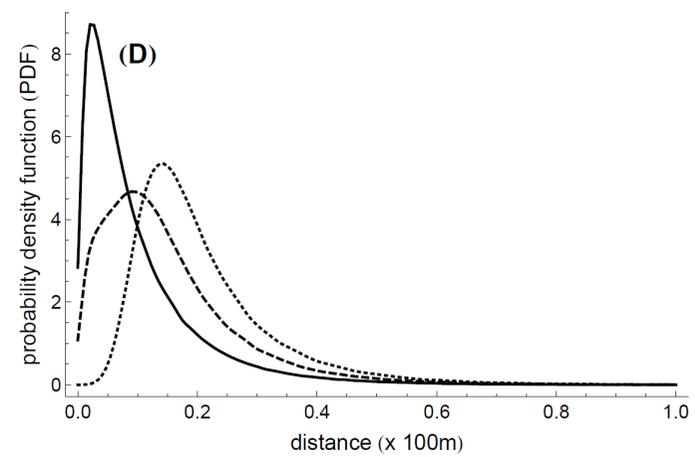
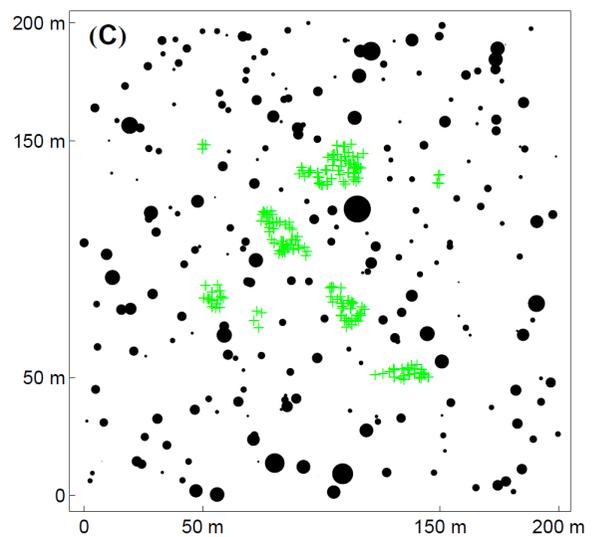
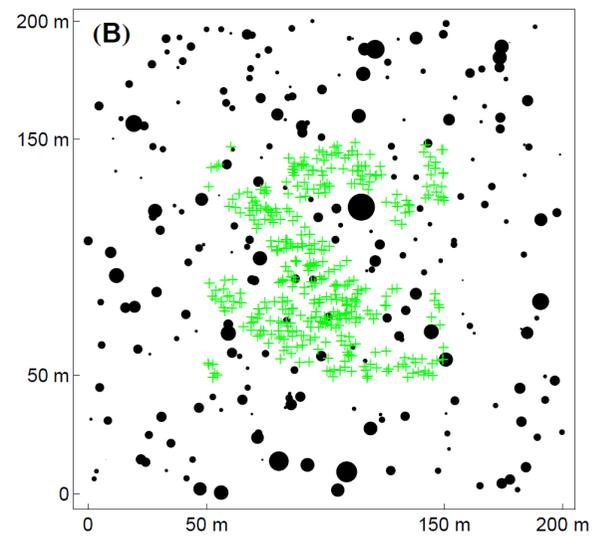
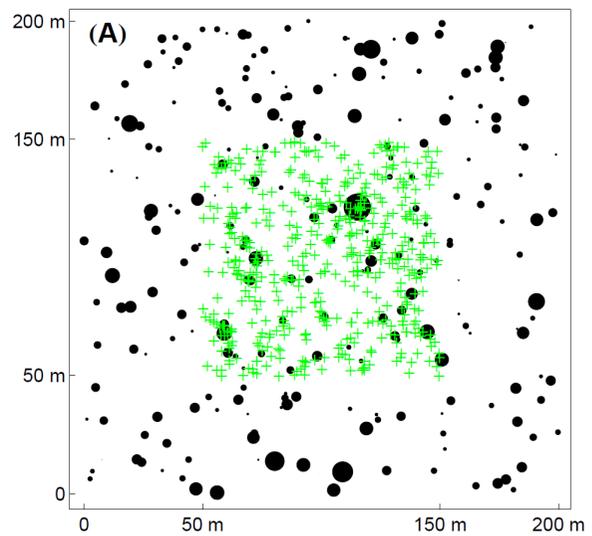
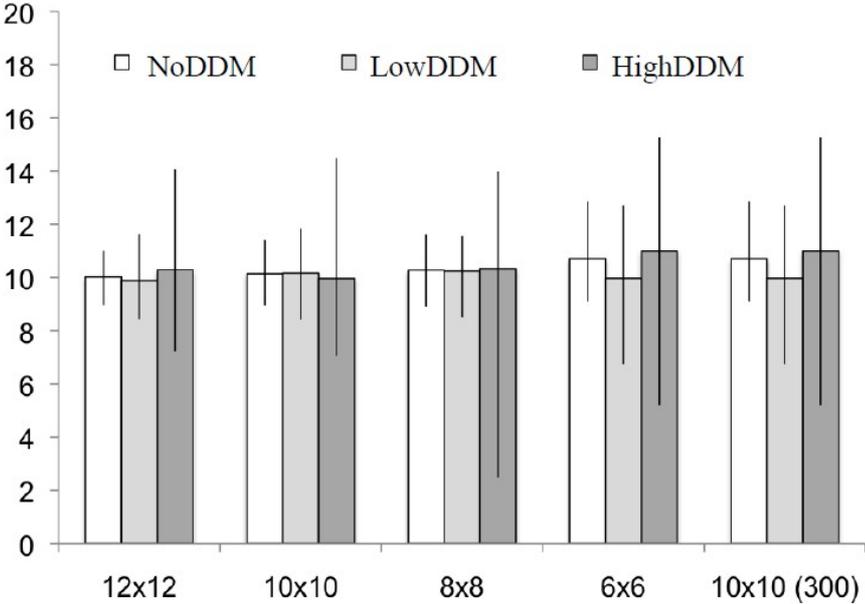


Figure 3)



Chapitre 5.

Estimation in-situ des gradients de sélection :
Approche d'analyses de parenté

5) Estimation in-situ des gradients de sélection : Approche d'analyses de parenté

Dans le chapitre 2, nous avons abordé le lien entre les traits fonctionnels foliaires liés à l'économie de l'eau et les traits de performance que sont la croissance et la production de graines pour une population de hêtre commun du Mont Ventoux soumise à des contraintes hydriques. Dans le chapitre 3, nous avons également évalué potentiel adaptatif de cette même population, c'est-à-dire que nous avons estimé des paramètres d'héritabilité in-situ pour les traits fonctionnels étudiés ainsi que les corrélations génétiques entre ces traits. Enfin dans le chapitre 4, nous avons caractérisé les capacités de dispersion du pollen et des graines. Ces différents points sont fondamentaux pour aborder la question générale des capacités d'adaptation à la sécheresse des plantes longévives que sont les arbres. Dans le même objectif, nous traiterons dans ce dernier chapitre de la force de la sélection sur les traits fonctionnels foliaires en condition de contrainte hydrique.

1) Introduction

Pour mettre en évidence la valeur sélective des traits fonctionnels, une grande majorité des études testent l'origine adaptative de la divergence génétique pour ces traits entre populations ayant évolué dans des milieux contrastés (Edelaar *et al.* 2011 pour une revue récente). L'approche la plus rigoureuse consiste à comparer la divergence génétique observée pour les traits en jardin commun (Q_{st}) avec la différenciation pour des marqueurs moléculaires neutres traditionnellement mesurée par le F_{st} de Wright (Whitlock 2008). Pour l'instant, les études ayant utilisé cette approche pour mettre en évidence une adaptation au climat chez les arbres ont surtout porté sur la croissance et la phénologie du débourrement végétatif. Elles ont permis d'identifier que la phénologie était sous sélection divergente ; En jardin commun, selon les espèces les populations de hautes latitudes/altitudes débourrent plus tôt (hêtre) ou plus tard (frêne) que les populations de basses latitudes/altitudes (chercher la synthèse phéno, Vitasse *et al.* 2010, Alberto *et al.* 2011). D'autres études chez les arbres mais surtout chez d'autres taxons ont porté sur les traits foliaires morpho-physiologiques dont par exemple l'efficacité de l'eau approximée avec le $\delta^{13}C$. Ainsi, ces études mettent en évidence des divergences génétique du $\delta^{13}C$ entre provenances en lien avec les conditions hydriques d'origine (Donovan et Ehleringer 1994, Dudley 1996, Voltas *et al.* 2008, Lamy *et al.* 2011). A contrario, Ramirez-

Valiente *et al.* 2009 en utilisant des approches de comparaison Q_{st} - F_{st} sur des populations de chêne liège provenant de l'ensemble de l'Espagne trouvent de trop faibles Q_{st} pour pouvoir conclure à une divergence adaptative du $\delta^{13}C$. Leur hypothèse est que la diversité génétique intra-population est trop importante pour avoir une bonne puissance de détection.

Ces études sont très utiles pour identifier les valeurs optimales associées à chaque environnement et poser de premières hypothèses sur la vitesse d'évolution ainsi que sur les mécanismes d'adaptation (Savolainen *et al.* 2007). Cependant, la divergence entre les populations mesurée par le Q_{st} est le résultat complexe de l'interaction entre la dérive, les flux de gène et la sélection¹. En théorie la comparaison Q_{st} - F_{st} permet de séparer ces effets, mais cette comparaison est délicate, en particulier du fait des propriétés des différents indices disponibles pour mesurer différenciation neutre (F_{st} , G_{st} , G_{st}' ou D , Jost 2008, Whitlock 2011). Par ailleurs, ces études testent la divergence entre populations sous l'effet de la sélection naturelle passée mais ne mesurent pas directement la force de cette sélection passée (Hendry & Kinnison 1999), et encore moins la force de la sélection à l'œuvre actuellement. Par exemple, la sélection peut considérablement fluctuer entre années et ce genre d'étude peut emmener à sous estimer la force de la sélection naturelle et ainsi négliger les conséquences de cette fluctuation notamment sur la diversité génétique intra-populationnelle (Bell 2010).

Une approche plus rigoureuse pour estimer la valeur adaptative des traits et mesurer la sélection contemporaine à l'œuvre dans les populations naturelles consiste à corréliser la fitness des individus avec leurs traits phénotypiques. Cette approche a été formalisée par Lande & Arnold (1983). Le gradient de sélection directionnel (β) est le coefficient de corrélation entre fitness relative et valeur de trait standardisé, et permet de caractériser l'action de la sélection directionnelle sur le trait. Lorsque plusieurs traits déterminent la fitness le gradient de sélection directionnel est estimé par le coefficient de régression partielle de la fitness relative contre la valeur du trait standardisé. L'action de la sélection stabilisante ou disruptive peut être caractérisée en introduisant la forme quadratique du trait dans le modèle de régression multiple et estimant le coefficient de régression du terme quadratique (γ).

1 Un exemple très didactique d'une étude diachronique de l'interaction flux de gène-sélection a été publié en 2005 par Postma & Noordwijk dans la revue Science.

Deux grands types d'approches existent à ce jour pour mesurer les gradients de sélection chez les plantes. La première approche, la plus répandue, utilise des traits performance dont les liens avec la fitness des individus sont connus (Violle *et al.* 2007). Ce sont classiquement la croissance (Donovan *et al.* 2009, Ramirez-Valiente *et al.* 2010), la production de graine (Dudley 1996, Agrawal *et al.* 2008) et la survie (Ehleringer 1993). La seconde approche se base sur des analyses de parenté pour estimer directement le succès reproducteur des individus (Smouse *et al.* 1999). Avec la seconde approche la sélection n'est pas mesurée avec une approximation de la fitness comme tel est le cas avec la première, mais avec une mesure directe de la fitness. Or il est connu que la fitness se construit à partir de l'interaction complexe de diverses composantes auxquelles les traits de performances sont reliés, la première approche livrant ainsi une vision partielle de la fitness comparativement à la seconde (Meagher 1991, Dudley 1996). La seconde approche semble donc mieux indiquée pour accéder à la valeur adaptative des traits alors que la première est a priori plus utile pour comprendre les mécanismes.

Les analyses de parenté se sont développées récemment notamment à la faveur de la mise au point chez de très nombreuses espèces de marqueurs moléculaires hautement variables comme les microsatellites. En parallèle, le développement important des outils statistiques permet d'optimiser l'analyse des données microsatellites. Ainsi, récemment un modèle de croisement spatialement explicite ou SEMM (spatially explicit mating model) a été développé pour estimer simultanément la courbe de dispersion du pollen et des graines et les gradients de sélection à partir de données génétiques et spatiales de semis et d'adultes (voir le chapitre 4 pour une présentation détaillée). Son nom fait directement allusion à sa fonction qui est de décrire en tout point de l'espace la composition génétique des nuages de pollen et/ou de la pluie de graine en fonction de la configuration spatiale des reproducteurs potentiels et de leur valeur phénotypique, à partir du succès reproducteur observé (Burzyck *et al.* 2002, Burzyck *et al.* 2006, Oddou-Muratorio & Klein 2008). De manière générale, le SEMM a été utilisé dans le but principal d'évaluer l'étendue des flux de gène par pollen (Burzyck *et al.* 2002, Austerlitz *et al.* 2004) et par graine (Burzyck *et al.* 2006, Oddou-Muratorio & Klein 2008). Néanmoins, le SEMM peut aussi être utilisé dans le but principal d'estimer les gradients de sélection sur des traits liée à la fertilité mâle ou femelle, tout en prenant en compte la variabilité du succès reproducteur liée aux effets spatiaux (Morgan & Conner 2001, Burczyk 2002). Un autre avantage du SEMM est qu'il repose sur des assignations fractionnelles de parenté ce qui diminue l'effet des erreurs d'assignation sur l'estimation des paramètres. En contrepartie, il a été avancé que cela diminue l'intensité des gradients estimé, un grand nombre de parents étant souvent compatibles. A notre connaissance les estimations de gradient de sélection faites avec ces modèles concernent

exclusivement les traits liés à la taille de l'arbre (diamètre, hauteur) ou à la l'abondance de la floraison (Meagher 1991, Smouse *et al.* 1999, Morgan & Conner 2001, Oddou-Muratorio *et al.* 2005). Cette étude est la première à appliquer le SEMM pour mesurer la sélection s'exerçant sur des traits écophysiologiques chez une plante.

L'objectif de cette étude est de mesurer la force de la sélection contemporaine s'appliquant sur des traits fonctionnels foliaires liés à l'économie de l'eau pour une population de hêtre commun (*Fagus sylvatica*) expérimentant des conditions hydriques stressantes liée à des sécheresses estivales chroniques. Pour cela, nous avons mis en œuvre des approches d'analyse de parenté entre des adultes et des semis de l'année. Nous avons utilisé le SEMM afin de modéliser et d'estimer les gradients de sélection directionnels et quadratiques sur les traits fonctionnels foliaires en prenant en compte la variabilité du succès reproducteur liée à la configuration spatiale des semenciers.

2) Matériel et méthode

2.1) Site d'étude et espèce étudiée

Les caractéristiques biologiques et écologique du hêtre commun sont décrites dans le chapitre 1, 2 et 3. La population d'adulte étudiée diffère de la population décrite au chapitre 2 et 3, car nous avons décidé de retenir également les brins de cèpée identifiés comme étant des clones, les considérant comme des sources potentielles de graines, ce qui donne un total de 170 adultes/brins de cèpées. Pour les besoins de cette étude, nous avons par ailleurs échantillonné 150 semis. Les semis ont été échantillonnés au début de septembre 2010. Des feuilles ont été récoltées sur les adultes et les semis pour en extraire l'ADN. Les adultes et les semis ont été cartographiés. Concernant les adultes, le diamètre ainsi qu'un ensemble de traits fonctionnels (décrits au chapitre 2) ont été mesurés :

Figure 9 : Représentation du plan d'échantillonnage pour l'étude des gradients de sélection avec le SEMM. Les ronds gris représentent les arbres adultes et les étoiles représentent les semis. La délimitation de la placette est figurée par un trait rouge.

Traits fonctionnels étudiés

Voir le descriptif des mesures au chapitre 2. Dans ce chapitre, nous avons retenu pour les analyses un sous échantillon des traits présentés au chapitre 2 à savoir, la dynamique de débourrement (SSP), la masse surfacique foliaire (LMA), la masse foliaire (LM), le $\delta^{13}\text{C}$ foliaire et la quantité d'azote par unité de masse foliaire (N_{mass}). Pour rappel l'ensemble de ces traits ont été mesurés en 2009, c'est à dire la même année de reproduction dont est issue la cohorte de semis échantillonnée.

2.2) Génotypage

L'ensemble des 320 individus ont été génotypés pour 13 marqueurs microsatellites avec deux multiplexes : (1) FS1-15 et FS3-04 (Pastorelli *et al.*, 2003); sfc0007-2, sfc0018, sfc0036, sfc1063 et sfc1143 (Asuka *et al.*, 2004); et (2) mfs7 (Vornam *et al.*, 2004); csolfagus-5, csolfagus-6, csolfagus-25, csolfagus-29, et csolfagus-31 (Vendramin, pers. comm.). Il s'agit d'un sous échantillon des 19 marqueurs utilisés pour les estimations d'héritabilité in-situ. Leurs caractéristiques en termes de polymorphisme, d'allèles nuls, de déséquilibre de liaison et de F_{is} sont présentées au chapitre 3.

2.3) Description du modèle

Nous avons modélisé à la fois les gradients de sélection et la courbe de dispersion avec le SEMM présenté dans le chapitre 4. Pour rappel, considérant N l'ensemble des reproducteurs potentiels du site étudié, le modèle décrit la probabilité d'observer le génotype des semis échantillonnés en fonction de divers paramètres qui sont : m_s le taux de migration des graines, m_p le taux de migration du pollen, s le taux d'autofécondation, les paramètres des fonctions de dispersion du pollen et des graines et enfin les fonctions décrivant l'effet de traits phénotypiques sur la fécondité mâle et femelle des arbres adultes (matériel et méthode, chapitre 4) Ψ_{ij} et Φ_{jk} qui prédisent respectivement, la proportion de graine d'une mère j attendue à la position du semis i et la proportion de pollen d'un père k dans le nuage pollinique reçu par une mère j . Ce modèle considère que lorsqu'un seul adulte compatible est retrouvé, il s'agit de la mère, suivant les attendus selon lesquels la dispersion du pollen, anémophile chez le hêtre est plus étendue que la dispersion des graines barochore et zoochore.

Modèles pour les gradients de sélection

Ici, nous nous intéressons plus particulièrement aux fonctions Ψ_{ij} et Φ_{jk} qui prédisent respectivement, la proportion de graine d'une mère j attendue à la position du semis i et la proportion de pollen d'un père k dans le nuage pollinique reçu par une mère j

Ψ_{ij} s'écrit :

$$\Psi_{ij} = \frac{\tau_{ij}}{\sum_{l \in N} \tau_{il}} \quad \text{Équation 18}$$

Où τ_{ij} est une fonction de la distance mère-descendant et des traits phénotypiques des mères.

Φ_{jk} s'écrit :

$$\Phi_{jk} = \frac{\pi_{jk}}{\sum_{l \in N} \pi_{jl}} \quad \text{Équation 19}$$

Où π_{ij} est une fonction de la distance père-mère et des traits phénotypiques des pères.

Les variables phénotypiques utilisées pour modéliser la variation de succès reproducteur ont été : LMA, LM, SSP, $\delta^{13}\text{C}$, N_{mass} .

Pour chaque trait phénotypique P , la fonction de fitness f_P à été modélisée :

$$f_P(\beta_P, \gamma_P; P_j) = \exp\left(\beta_P P_j + \gamma_P (P_j - \bar{P})^2\right) \quad \text{Équation 20}$$

Avec β_p et γ_p les gradients de sélection directionnel et quadratique pour un trait P et P_j le phénotype de la mère j .

Pour évaluer la sélection, nous avons suivi trois étapes. Nous avons tout d'abord calculé des différentiels de sélection sur chacun des n traits considérés à partir de n modèles n'incluant l'effet que d'un trait à la fois sans tenir compte de l'effet indirect des autres traits (modèle 1). Ce terme peut être confondu avec celui qui est utilisé pour désigner la différence de moyenne entre la population de parents avant sélection et après sélection, nous l'employons ici comme il est d'usage dans la littérature pour désigner les gradients de sélection intégrant les effets directs de la sélection et les effets indirects dus aux corrélations phénotypiques avec les traits co-sélectionnés. Nous avons ensuite inclus seulement l'effet du diamètre et de chaque trait considérant donc que les paramètres estimés sont considérés comme intermédiaires entre un différentiel de fitness et un gradient de sélection (modèle 2). Enfin, nous avons estimé des gradients de sélection en construisant un modèle incluant l'effet de l'ensemble des traits simultanément et en estimant le coefficient de régression partielle de chaque trait sur la fitness (modèle 3).

1) Modèle 1 : pour chaque trait, τ_{ij} s'exprime comme suit :

$$\tau_{ij} = p_S(a_S; d_{ij}) \times f_P(\beta_P, \gamma_P; P_j) \quad \text{Équation 21 (modèle 1)}$$

Où p_S est la courbe de dispersion des graines (décrite dans le paragraphe suivant)

2) Modèle 2 : On ajoute à l'équation 21 l'effet du diamètre, τ_{ij} s'exprime comme suit :

$$\tau_{ij} = p_S(a_S; d_{ij}) \times f_P(\beta_P, \gamma_P; P_j) \times D_j^\rho \quad \text{Équation 22 (modèle 2)}$$

Où D_j est le diamètre de la mère j et ρ le paramètre de sélection sur le diamètre.

- 3) Modèle 3 : L'effet de l'ensemble des variables, traits fonctionnels, diamètre et configuration spatiale est inclus dans le modèle, τ_j s'exprime comme suit :

$$\tau_{ij} = p_S(a_S; d_{ij}) \times f_{LMA}(\beta_{LMA}, \gamma_{LMA}; LMA_j) \times f_{LM}(\beta_{LM}, \gamma_{LM}; LM_j) \times f_{SSP}(\beta_{SSP}, \gamma_{SSP}; SSP_j) \\ f_{\delta^{13}C}(\beta_{\delta^{13}C}, \gamma_{\delta^{13}C}; \delta^{13}C_j) \times f_{N_{mass}}(\beta_{N_{mass}}, \gamma_{N_{mass}}; N_{mass_j}) \times D_j^\rho$$

Équation 23 (modèle 3)

Où f_{LMA} est la fonction de fitness du LMA, f_{LM} est la fonction de fitness de LM, f_{SSP} est la fonction de fitness de SSP, $f_{\delta^{13}C}$ est la fonction de fitness du $\delta^{13}C$ et $f_{N_{mass}}$ est la fonction de fitness de N_{mass} , D_j est le diamètre de la mère j et ρ est le paramètre de sélection sur le diamètre.

Par ailleurs, nous avons choisi d'évaluer seulement les gradients de sélection femelle. En effet, le taux d'attribution généralement moins fort pour le pollen rend difficile la détection des gradients de sélection.

π_{jk} s'écrit donc seulement en fonction de la courbe de dispersion du pollen p_p :

$$\pi_{jk} = p_p(a_p; d_{jk}) \quad \text{Équation 24}$$

2.4) Modèle pour la courbe de dispersion

Dans ce chapitre, nous avons plutôt suivi l'approche de Burzyck *et al.* (2006) qui consiste à utiliser une fonction de type exponentielle simple pour modéliser la courbe de dispersion du pollen et des graines dont la formule est la suivante (Austerlitz *et al.* 2004) :

$$p_e(a_e; d) = \frac{1}{2\pi a_e^2} \exp\left(-\frac{d}{a_e}\right) \quad \text{Équation 25}$$

Où a_e est le paramètre de dispersion et d est la distance entre soit le père et la mère (p_p) soit le semis et la mère (p_s).

Cette fonction permet de modéliser une dispersion dite leptokurtique, c'est-à-dire qu'elle modélise une majorité des événements de dispersion à courte distance, mais elle autorise aussi quelques événements de dispersion à moyenne et longue distance (Austerlitz *et al.* 2004). Ici, seul un paramètre a_e lié à la distance moyenne de dispersion est estimé, ce qui ne permet pas de caractériser au mieux l'étendue de la dispersion. Il existe d'autres fonctions qui permettent de mieux décrire la forme de la courbe de dispersion et notamment de mieux prendre en compte les événements de dispersion à longue distance (Austerlitz *et al.* 2004). Nous avons délibérément décidé de ne pas les utiliser ici car ce sont des fonctions qui prennent considérablement plus de temps à estimer que la fonction exponentielle simple et ce n'était pas le but premier de l'étude.

2.5) Estimation de paramètres et comparaison des modèles

Pour estimer les paramètres des différents modèles, nous avons procédé par maximisation de la fonction de vraisemblance correspondant à chacun des modèles. La fonction de vraisemblance s'écrit pour le modèle 1 de la manière suivante :

$$\log L(a_p, a_s, s, m_p, m_s, \beta_p, \gamma_p) = \sum_{i=1}^S \log [P(G_i)] \quad (\text{modèle 1})$$

Avec a_p et a_s le paramètre de dispersion du pollen et des graines respectivement, s le taux d'autofécondation, m_p et m_s le taux de migration du pollen et des graines respectivement, β_p le différentiel de fitness directionnel et γ_p le différentiel de fitness quadratique.

La fonction de vraisemblance s'écrit pour le modèle 2 de la manière suivante :

$$\log L(a_p, a_s, s, m_p, m_s, \beta_p, \gamma_p, \rho) = \sum_{i=1}^S \log [P(G_i)] \quad (\text{modèle 2})$$

Avec ρ l'effet du diamètre et pour les autres paramètres, voir le modèle 1.

La fonction de vraisemblance s'écrit pour le modèle 3 de la manière suivante :

$$\log L(a_P, a_S, s, m_P, m_S, \beta_{LMA}, \gamma_{LMA}, \beta_{LM}, \gamma_{LM}, \beta_{SSP}, \gamma_{SSP}, \beta_{\delta^{13}C}, \gamma_{\delta^{13}C}, \beta_{N_{mass}}, \gamma_{N_{mass}}, \rho) = \sum_{i=1}^S \log [P(G_i)]$$

avec

Pour tester la significativité des gradients de sélection directionnels et quadratiques, nous avons mené une procédure de type III en utilisant les paramètres estimés avec le modèle 3. Pour chaque trait, nous avons dans un premier temps recalculé la vraisemblance du modèle en enlevant γ_p au modèle complet (modèle 3') et dans un deuxième temps nous avons enlevé β_p en plus du gradient quadratique (modèle 3''). Puis nous avons testé la significativité de γ_p et de β_p avec un test du rapport des vraisemblances (LRT, likelihood ratio test) en comparant respectivement : 1) le modèle 3 et le modèle 3' et 2) le modèle 3' et le modèle 3''.

Pour tester la significativité des gradients de sélection calculés avec les modèles 1 et 2, nous avons suivi la même procédure que pour les gradients de sélection, à savoir que nous avons calculé un modèle 1' et un modèle 2' ôté de l'effet de γ_p et un modèle 1'' et un modèle 2'' ôté de l'effet de β_p . Puis nous avons procédé à un LRT entre les couples de modèles suivants modèles 1-1', modèles 1'-1'', modèles 2-2', modèles 2'-2'', ce qui donne respectivement un test de γ_p et β_p pour le modèle 1 et un test de γ_p et β_p pour le modèle 2.

2.6) Gradients de sélection : standardisation

Les paramètres ont été estimés à partir des valeurs non transformées des traits phénotypiques. Concernant les gradients directionnels β , afin d'obtenir des valeurs comparables entre trait ainsi qu'avec la littérature nous avons transformé les valeurs obtenues de β en gradients de sélection standardisés β_{SD} , c'est-à-dire que nous avons calculé le taux d'augmentation de la fitness par unité d'écart-type du trait (Conner 2001).

3) Résultats

3.1) Paramètres de dispersion et taux d'autofécondation

En modélisant la dispersion du pollen et des graines avec une fonction de type exponentielle simple, la valeur moyenne de dispersion estimée est de 34 m pour le pollen et de 17 m pour les graines sur la placette étudiée. Les taux de migration du pollen et des graines ont été estimés à 48% et 19% respectivement. Le taux de d'autofécondation estimé est égal à 0.7%.

3.2) Différentielles de sélection et gradients de sélection

Considérant le modèle 3, nous avons trouvé des valeurs positives fortes des gradient de sélection directionnel pour SSP ($\beta_{SSP}=0.10$, $\beta_{SD-SSP}=0.65$, $p_{val}<0.001$) et le $\delta^{13}C$ ($\beta_{\delta^{13}C}=0.69$, $\beta_{SD-\delta^{13}C}=0.69$, $p_{val}<0.001$), et une valeur négative pour LM ($\beta_{LM}=-1.09$, $\beta_{SD-LM}=-0.56$, $p_{val}=0.01$). En revanche les gradients directionnels pour le LMA ($\beta_{LMA}=0.01$, $\beta_{SD-LMA}=0.19$, $p_{val}=0.93$) et pour N_{mass} ($\beta_{N_{mass}}=-0.26$, $\beta_{SD-N_{mass}}=-0.07$, $p_{val}=0.99$) dont les valeurs estimées sont faibles n'ont pas été trouvés significatifs. Peu de gradients quadratiques ont été trouvés significatifs et seuls LM ($\gamma_{LM}=-3.13$, $p_{val}=0.03$) et le LMA ($\gamma_{LMA}=-0.001$, $p_{val}=0.03$) ont été trouvés sous sélection stabilisante.

Pour résumer ces premiers résultats, ont un meilleur succès reproducteur, les individus qui débourent tôt (SSP fort), possèdent de plus forts $\delta^{13}C$ (=meilleure efficacité d'utilisation de l'eau) et des feuilles de faible poids (LM) (Figure 10). Par ailleurs, le patron de sélection stabilisante dégagé pour le LMA indique que la valeur optimale en termes de succès reproducteur est proche de la moyenne de la population (Figure 10). Enfin, nous mettons également en évidence la présence d'un optimum pour LM fortement décalé vers les faibles valeurs du fait d'une forte sélection directionnelle.

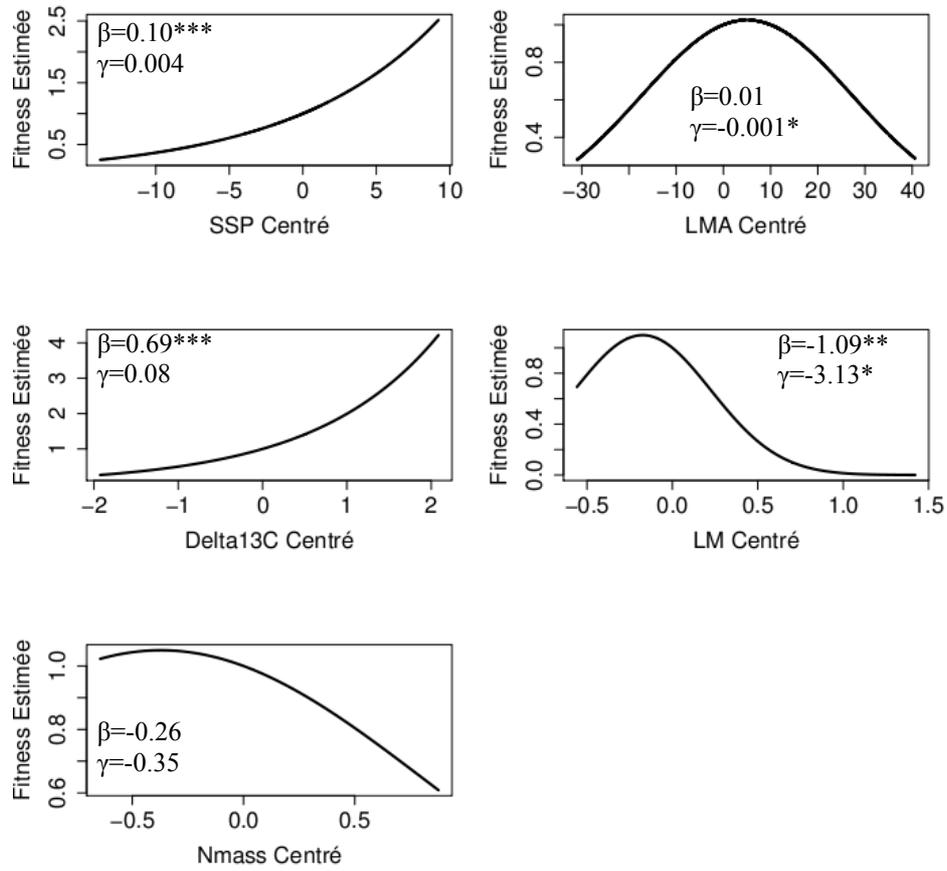


Figure 10 : Représentation graphique des gradients de sélection estimés au modèle 3. Les valeurs des coefficients directionnels et quadratiques sont présentés au tableau 2.

$p_{val} \leq 0.05$: * ; $p_{val} \leq 0.01$: ** ; $p_{val} \leq 0.001$: ***

En comparant les gradients de sélection estimés par les modèle 1 et modèle 2 avec les gradients de sélection estimés avec le modèle 3, nous trouvons des différences de patron de sélection (Tableau 2). Dans un premier temps, inclure le diamètre dans le modèle de fécondité (modèle 2) modifie l'estimation des différentielles quadratiques : γ_{SSP} et $\gamma_{\delta^{13}C}$ qui était significatifs avec le modèle 1 (γ_{SSP} : $p_{val}=0.002$, $\gamma_{\delta^{13}C}$: $p_{val}=0.001$) résultant en une sélection stabilisante, ne le sont plus une fois le diamètre inclus dans le modèle (γ_{SSP} : $p_{val}=0.84$, $\gamma_{\delta^{13}C}$: $p_{val}=0.29$). Ainsi, probablement du fait de la présence du diamètre, γ_{SSP} et $\gamma_{\delta^{13}C}$ ne sont pas non plus significatifs avec le modèle 3 (Tableau 3). Ceci vient probablement que les arbres de très forts diamètres qui sont les principaux contributeurs ont également des valeurs moyennes de SSP et de $\delta^{13}C$. Par ailleurs, le gradient de sélection quadratique qui n'était pas significatif pour le LMA avec le modèle 1, devient marginalement significatif avec le modèle 2 et significatives avec le modèle 3 (Tableau2).

Inclure le diamètre dans le modèle de fécondité modifie également les gradients de sélection. Ainsi, le gradient de sélection sur le LMA qui était négatif, se retrouve non significatif (Figure 11). Par ailleurs $\beta_{\delta^{13}C}$ se retrouve être fortement affecté par l'inclusion d'autres variables, chutant fortement entre le modèle 1 et 2 et augmentant entre le modèle 2 et le modèle 3 (Figure 11). Ainsi la forte contribution des gros arbres accentue le désavantage des arbres faiblement efficaces, alors que le fait de porter d'autres traits fonctionnels favorables minimise ce désavantage. Dans l'ensemble, les estimations pour les autres traits sont constantes avec toutefois une légère augmentation de β_{SSP} entre les trois modèles.

Alors que les gradients de sélection sont très significatives pour l'ensemble des traits à la fois pour le modèle 1 et le modèle 2, cela n'est plus le cas lorsque l'effet de l'ensemble des traits est inclus dans le même modèle et β_{LMA} et $\beta_{N_{mass}}$ qui étaient significatifs au modèle 1 et 2 malgré de faibles valeurs, ne le sont plus avec le modèle 3 (Tableau 2).

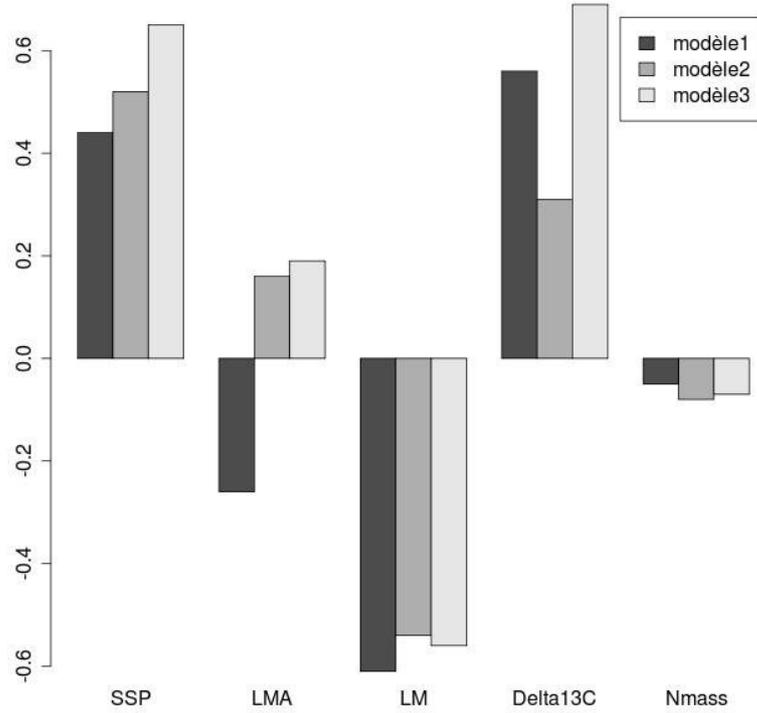


Figure 11 : Gradients de sélection standardisés directionnels pour les trois modèles (voir section « Modèles pour les gradients de sélection »)

Tableau 2 : Différentielles de sélection et des gradients de sélection directionnels (β) et quadratiques (γ) pour les modèles 1 2 et 3 (voir la description des modèles dans le matériel et méthode). Dans le modèle 1, l'effet de chaque trait est évalué indépendamment β et γ sont donc des différentielles de sélection regroupant les effets indirects des autres traits. Dans le modèle 2, l'effet de chaque trait est évalué avec l'effet du diamètre de l'arbre. Dans le modèle 3, l'effet de l'ensemble des traits est évalué conjointement, β et γ sont donc des gradients de sélection (Lande & Arnold 1983). β_{SD} sont les différentielles et les gradients de sélection standardisés.

	β			γ			β_{SD}		
	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3
SSP	0.07***	0.08***	0.10***	-0.01***	-0.001	0.004	0.44***	0.52***	0.65***
LMA	-0.02***	0.01***	0.01	0	-0.001.	-0.001*	-0.26***	0.16***	0.19
LM	-1.67***	-1.01***	-1.09**	-7.28***	-5.30***	-3.13*	-0.61***	-0.54***	-0.56**
$\delta^{13}\text{C}$	0.59***	0.36***	0.69***	-0.48***	-0.132	0.08	0.56***	0.31***	0.69***
N_{mass}	-0.17***	-0.29***	-0.26	0.07	0.60	-0.35	-0.05***	-0.08***	-0.07

$p_{val} \leq 0.05$: *, $p_{val} \leq 0.01$: **, $p_{val} \leq 0.001$: ***

Tableau 3 : Test de la significativité des différentielles estimées au modèle 1 et 2 et des gradients de sélection estimés au modèle 3 (voir section « *Modèles pour les gradients de sélection* » pour l'écriture des modèles). *df* est le nombre de degré de liberté, *K* est la statistique du test du rapport des vraisemblances (voir section « *Tests statistiques* »).

	β									γ								
	Modèle 1			Modèle 2			Modèle 3			Modèle 1			Modèle 2			Modèle3		
	<i>df</i>	<i>K</i>	<i>P value</i>															
SSP	1	23.04	<0.001	1	13.82	<0.001	1	14.90	<0.001	1	9.64	0.002	1	0.04	0.84	1	0.36	0.55
LMA	2	26.27	<0.001	2	9.68	0.008	2	0.14	0.93	1	1.22	0.27	1	3.01	0.08	1	4.90	0.03
LM	2	42.86	<0.001	2	18.12	<0.001	2	8.94	0.01	1	19.44	<0.001	1	14.98	<0.001	1	4.82	0.03
$\delta^{13}\text{C}$	2	21.34	0.00	2	15.24	0.00	2	15.70	<0.001	1	11.88	0.001	1	1.12	0.29	1	0.22	0.64
N_{mass}	2	17.30	<0.001	2	10.42	0.005	2	0.02	0.99	1	0.02	0.89	1	0.38	0.53	1	0.28	0.57

4) Discussion

Dans ce chapitre nous avons évalué la force de la sélection s'appliquant sur des traits fonctionnels foliaires liés ou à l'économie en eau. Pour ce faire nous avons modélisé le lien entre les traits phénotypiques et le succès reproducteur estimé par analyse de parenté en utilisant le modèle de croisement spatialement explicite (SEMM). D'après la synthèse de Kingsolver *et al.* (2001) des valeurs de gradients de sélection estimées en population naturelle, les valeurs estimées ici pour la dynamique de débourrement, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la masse foliaire indiquent une force de la sélection considérable et peu fréquente. La population étudiée expérimentant en conditions de ressource en eau limitante ce qui contraint l'assimilation carbonée et donc la reproduction, nous sommes probablement dans des conditions idéales pour observer la sélection. Ainsi, la forte sélection directionnelle sur la dynamique du débourrement, l'efficacité d'utilisation de l'eau et la masse foliaire suggère que ces traits liés à l'assimilation du carbone jouent un rôle majeur dans l'adaptation des individus à un environnement fortement contraint par les ressources en eau.

Une forte sélection directionnelle devrait favoriser un déplacement de la moyenne des traits phénotypique rapide. Pour le LMA qui subit une sélection majoritairement stabilisante, le phénotype des individus devrait vers la valeur moyenne de la population, c'est-à-dire que la variance devrait baisser. L'évolution des valeurs phénotypiques est également conditionné par la base génétique des individus et par les corrélations entre traits. Ainsi, si la base génétique des traits est faible, même une forte sélection n'aura qu'un faible impact sur l'évolution des traits. De même, si les corrélations entre traits s'opposent au sens de la sélection, alors cela va freiner la vitesse d'évolution (mais voir Delph *et al.* 2011, Conner *et al.* 2011). La population étudiée se situe en partie basse d'un gradient altitudinal de hêtre et c'est celle qui expérimente les conditions les plus contraignantes en termes de ressources hydriques. De ce fait, les valeurs optimales sur la placette diffèrent possiblement du reste du gradient et cela peut entraîner une divergence génétique de la population avec celles de plus haute altitude.

Dans une étude sur le gradient altitudinal des Pyrénées, Vitasse *et al.* (2010) observent une divergence génétique pour la phénologie du débourrement de semis indiquant que les populations de basse altitudes ont évolué vers des sommes de températures chaudes requises pour le débourrement (« forcing ») que les populations de haute altitude (Vitasse *et al.* 2010). Il a été démontré que l'ajustement de la phénologie des individus aux fluctuations climatiques peut impacter considérablement la capacité reproductrice des individus et notamment l'occurrence de gelées tardives que risquent les individus précoces peut avoir des conséquences négatives (Chuine & Beaubien 2001). Ainsi le patron observé par Vitasse *et al.* (2010) est souvent interprété comme la

réponse évolutive au risque élevé des populations de basse altitude d'expérimenter des gelées tardives, mais peut également s'interpréter comme une sélection à plus haute altitude d'un forcing plus bas. Sur notre placette, la sélection mise en évidence suggère que les gelées tardives ne sont pas limitantes pour la population considérée mais qu'au contraire une initiation précoce de la saison de végétation bénéficie à la reproduction et/ou à la survie des semis. Par ailleurs, le suivi des gelées tardives d'avril à juin de l'année 2006 et 2007 sur la placette a mis en évidence une très faible occurrence des gelées tardives (Cailleret & Davi 2010) ce qui potentiellement rend ce problème caduc, même s'il faudrait vérifier si ce patron se répète dans le temps. En revanche, une hypothèse plausible est que les sécheresses estivales conduisent à un avantage aux individus précoces, mais des hypothèses contraires ont déjà été avancées.

Pour la même population Bresson *et al.* (2011) observent également de la différenciation chez le hêtre pour le LMA et la quantité d'azote par unité de masse mais n'en observent pas pour le $\delta^{13}\text{C}$. Ramirez-Valiente *et al.* (2009) trouvent également pour le chêne liège à plus large échelle, une faible différenciation du $\delta^{13}\text{C}$ non significative, mais une différenciation relativement forte pour le LMA et la quantité d'azote par unité de masse. Dans cette étude, nous apportons des éléments soutenant l'hypothèse d'une valeur adaptative du $\delta^{13}\text{C}$ en condition de stress hydrique. Les semis observés ayant subi une phase de recrutement, la sélection mesurée intègre à la fois la reproduction et le recrutement. Ainsi soit le manque d'eau agit sur la production de fruit, soit cela agit sur le recrutement des semis. Nous confronterons les résultats observés ici avec les résultats obtenus au chapitre deux afin de séparer les effets.

Concernant les patrons de sélection directionnels sur la dynamique de débourrement et sur l'efficacité d'utilisation de l'eau, on peut noter qu'une tendance à l'augmentation des températures et à l'intensité des sécheresses estivales est observée sur le Ventoux depuis les dernières décennies (Cailleret 2011). Concernant la dynamique de débourrement, il est possible que conjointement à la forte augmentation des températures, les pressions de sélection dues aux gelées tardives aient diminuées ces dernières années. Ainsi Julie Gaüzère a montré lors de son stage de master 2, le même patron de différenciation pour le hêtre du Mont Ventoux.

Il faut noter que les problèmes de la covariance environnementale trait-fitness évoqués au chapitre 2 sont toujours valables dans cette étude et il est possible que les patrons de sélection observés soient surestimés. Ainsi, une certification de la valeur adaptative des traits étudiés nécessiterait soit d'utiliser la méthode de régression de la fitness avec les valeurs génétiques proposée par Rausher (1992), soit de caractériser exhaustivement l'hétérogénéité environnementale à micro-échelle, les deux méthodes pouvant se révéler très lourdes expérimentalement.

Discussion générale

Discussion générale

Dans cette thèse nous avons abordé la question de la vitesse de l'évolution génétique en population naturelle à travers l'étude du potentiel adaptatif d'une population de hêtre commun, en condition de stress hydrique. La discussion suivante s'articulera autour de trois axes majeurs. Premièrement, nous aborderons l'aspect méthodologique de la conduite d'études d'évolution contemporaine en milieu naturel dans le cas des populations d'arbres. Deuxièmement, nous discuterons les estimations du potentiel adaptatif obtenues dans la population étudiée et nous replacerons ces estimations dans le contexte des changements globaux. Troisièmement, nous discuterons de la signification des résultats obtenus dans le contexte plus général des capacités d'adaptation du hêtre et plus généralement des espèces d'arbres. Les deux premiers points sont traités séparément dans les différents chapitres et cette discussion générale a pour but de les mettre en perspective. Dans le dernier point nous confronterons nos résultats avec les études pré-existantes et discuterons des apports de cette démarche.

1) Étude in-situ de l'évolution contemporaine : aspects méthodologiques

Étudier l'évolution aujourd'hui requiert d'évaluer pour un ou plusieurs traits phénotypiques, l'intensité de la sélection ainsi que leur héritabilité et leur variance phénotypique ou génétique. Concernant les études in-situ, cette évaluation pose des difficultés méthodologiques et en particulier chez des espèces à long cycle de vie comme les arbres. Globalement un verrou majeur à la conduite d'études d'évolution contemporaine est la difficulté de l'estimation des relations d'apparentement et, chez les arbres en particulier, de la distribution des relations d'apparentement en population naturelle (avec peu d'apparentement fort).

1.1) Étude in-situ de la base génétique des caractères par la méthode de Ritland

Tout d'abord, nous montrons qu'il est possible dans certains cas d'estimer la variance génétique, l'héritabilité et les corrélations génétiques des traits phénotypiques en utilisant les méthodologies d'estimation in-situ existantes (Ritland 1996) et que les valeurs d'héritabilité estimées peuvent être non négligeables (ex : quantité d'azote foliaire, $h^2=0.53$). La méthode utilisée dans cette thèse est la méthode de régression développée par Ritland (1996) dont l'utilité a été maintes fois remise en cause (Coltman 2005, Gay *et al.* soumis). En effet, malgré la procédure corrective développée par Ritland (1996), cela reste une méthode hautement sensible aux erreurs d'estimation faites sur l'apparentement (voir l'introduction du chapitre 3, Coltman 2005). Ainsi il demeure pour le moment délicat d'utiliser les estimations d'héritabilité et de corrélation obtenues par cette méthode pour élaborer des scénarios précis de l'évolution des populations. En revanche l'ordre de grandeur des paramètres estimés permet de formuler de premières hypothèses sur la capacité des populations à répondre à la sélection. Par exemple, on attend que la masse surfacique foliaire qui, dans notre étude, montre des variations purement plastiques n'évolue pas au cours des générations, quelle que soit la force de la sélection.

Par ailleurs, la population étudiée dans cette thèse correspond à une situation idéale pour détecter une héritabilité significative. En effet, du fait d'une part de l'expansion récente de la population étudiée et d'autre part de la dispersion limitée du pollen et des graines (voir chapitre 4), l'apparentement moyen de la population est relativement fort comme l'indique le niveau significatif de structure génétique spatiale (SGS, voir chapitre 3). Un niveau d'apparentement moyen élevé de la population semble être un préalable majeur pour garantir une puissance suffisante de détection de l'héritabilité, comme le soulignent les quelques études ayant utilisées la méthode de Ritland (Andrew *et al.* 2005, Bouvet *et al.* 2008). En effet, l'estimation de l'héritabilité par la méthode de Ritland utilise la ressemblance attendue entre les apparentés, les individus non apparentés étant en toute logique peu informatifs.

Par ailleurs, la mauvaise estimation de l'apparentement des individus non apparentés par les marqueurs constitue une source de bruit supplémentaire, accentuant le biais d'estimation. Ainsi, les traits d'histoire de vie peuvent constituer de bons critères de sélection des espèces pour l'utilisation de la méthode de Ritland : Vekemans & Hardy (2004), ayant analysé une cinquantaine d'espèces de plante, démontrent que le niveau de SGS est fortement influencé par des traits comme le système de reproduction ou bien le mode de dispersion. L'histoire démographique de la population peut également être un bon critère comme cela est le cas dans notre étude. Dans tous les cas, des

estimations préliminaires à l'aide de marqueurs moléculaires du niveau moyen d'apparement et de la SGS peuvent aider à la décision du lancement d'une étude d'héritabilité in-situ, le niveau moyen d'apparement étant généralement bien estimé (Van De Castele *et al.* 2001).

1.2) Mesure de la force de la sélection par la régression trait/fitness

Dans cette étude, nous avons utilisé les données moléculaires des adultes et des semis, ainsi que les données phénotypiques des adultes pour estimer les gradients de sélection sur les traits phénotypiques par une approche basée sur les analyses de parenté et le modèle de croisement spatialement explicite (le SEMM; voir chapitre 5). L'apport de cette approche aux mesures de la sélection chez les plantes est double. Premièrement, elle permet directement de quantifier l'effet du trait ou d'une combinaison de traits sur le nombre de descendants établis, c'est-à-dire d'estimer plus « directement » la fitness que des analyses classiques qui se basent sur l'utilisation de traits de performance comme indicateurs de la fitness (voir chapitre 2).

Deuxièmement, la mesure de l'effet des traits sur le succès reproducteur intègre en théorie l'ensemble des effets sur les divers aspects de la performance individuelle des parents ce qui permet d'observer le résultat du processus complexe de la construction de la fitness. Par comparaison, les traits de performance participent ensemble à la construction de la fitness et sont donc corrélés avec elle, mais ne lui sont pas directement assimilables. Cependant, on peut remarquer qu'une lacune de l'analyse avec le SEMM est l'absence de la prise en compte de l'effet des traits sur la mortalité des adultes ainsi que sur la mortalité post-établissement des semis ; malgré une meilleure intégration du processus de construction de la fitness, le succès reproducteur au stade semis ne rend donc pas totalement compte de la fitness finale des individus. Par exemple, si les traits fonctionnels influencent différemment la survie et la longévité et que celle-ci a un effet sur la fitness, alors les prédictions peuvent être biaisées.

Pour résumer les apports majeurs de la mesure de la force de la sélection à partir d'analyses de parenté sont l'estimation de la fitness d'une part et une meilleure intégration du processus de construction de la fitness d'autre part. L'approche basée sur le SEMM est donc complémentaire de l'approche plus classique basée sur les traits de performance qui est en revanche plus utile pour décrire les mécanismes de construction de la fitness (voir chapitre 2). La comparaison entre les estimations de sélection réalisées à partir des deux approches sera détaillée dans la partie 2 de cette discussion.

Pour rappel, l'estimation de l'intensité de la sélection avec le SEMM est d'autant plus puissante que l'effet de la dispersion du pollen et des graines sur le succès reproducteur mâle et femelle est pris en compte (Morgan & Conner 2001). L'avantage du modèle de croisement spatialement explicite (SEMM) est non seulement de quantifier les gradients de sélection, mais aussi la dispersion du pollen et des graines. Pour parfaitement séparer les composantes du succès reproducteur d'origine spatiale (position des adultes et courbe de dispersion) et celles liées à la fertilité intrinsèque des individus, il faut échantillonner exhaustivement tous les adultes à l'intérieur du site étudié.

Dans le chapitre 4, nous avons évoqué la problématique de l'interaction entre la dispersion et le recrutement qui peut induire une modification de la courbe de dispersion des semis relativement à celle des graines. Nous avons démontré que le SEMM est insensible à ces effets de recrutement et qu'il estime bien la courbe de dispersion des graines à partir de données sur les semis. En théorie, la courbe de dispersion estimée par le SEMM est valable même pour les gammes de distances supérieures à celle correspondant à l'emprise de la population étudiée. La forme estimée de la courbe de dispersion est en particulier liée à l'importance de la dispersion à longue distance (plus la queue de la fonction de dispersion est lourde, plus les événements de dispersion à longue distance sont importants).

Néanmoins, on suspecte souvent que les courbes de dispersion du pollen et des graines estimées sont sensibles à l'échelle d'échantillonnage. En particulier, la dispersion à longue distance serait probablement sous-estimée par la fonction de dispersion estimée à partir des événements de dispersion intra-parcelle. Ainsi, la quantification de la dispersion à longue distance requiert l'utilisation d'autres méthodes considérablement plus lourdes et reste notoirement difficile à estimer.

Par ailleurs, du fait des forts taux d'immigration du pollen habituellement observés, le SEMM calibré sur les semis est peu efficace pour estimer précisément la courbe de dispersion du pollen et les estimations réalisées à partir de graines échantillonnées sur l'arbre mère (analyse de paternité) sont probablement plus fiables. Pour conclure, le gain d'information lié à la prise en compte des processus spatiaux étant considérable à la fois pour la mesure de la sélection et pour la quantification de la dispersion, nous recommandons donc dans la mesure du possible de ne pas s'en affranchir dans les études de parenté. Néanmoins, le SEMM ne permet généralement pas d'estimer précisément la composante à longue distance de la dispersion des gènes, qui est pressenti comme majeure dans le cadre de l'adaptation génétique des populations (Lenormand *et al.* 1999).

1.3) Mise en œuvre conjointe des mesures de sélection et de paramètres génétiques

La combinaison des deux approches utilisées dans cette thèse (génétique quantitative in-situ + SEMM) permet d'obtenir des estimations semi-quantitatives des capacités d'évolution contemporaine. A priori, l'intensité de la sélection est correctement quantifiée par le SEMM ; en revanche, du fait du biais de la méthode de Ritland, nous n'obtenons qu'une indication du niveau de l'héritabilité et les corrélations génétiques (sur une échelle allant de faible, moyenne à forte respectivement pour chaque paramètre). La combinaison de ces différentes informations informera donc sur capacité d'un trait à répondre à la sélection mais aussi sur la vitesse de l'évolution, sans pour autant la quantifier précisément.

Pour illustrer ce point dans un cas concret, considérerons deux traits T et T' pour lesquels le gradient de sélection est de 0.16 (en unité d'écart-type), soit la valeur médiane de l'intensité de la sélection mesurée dans les études de microévolution compilées par Kingsolver *et al.* (2001) ; si le trait T présente une héritabilité estimée par la méthode de Ritland de 0.15 (héritabilité moyenne) et le trait T' une l'héritabilité estimée par la méthode de Ritland de 0.30 (héritabilité forte), on pourra alors conclure que la vitesse d'évolution du trait T sera « faible » alors que celle du trait T' sera « plutôt rapide ». Si le gradient de sélection est plus fort, par exemple dans la queue de la distribution estimée par Kingsolver *et al.* (2001), alors la vitesse d'évolution du trait T sera « plutôt rapide » et celle du trait T' sera « très rapide ». La combinaison des estimations de l'intensité de la sélection et des paramètres génétiques permet donc de faire des prédictions semi-quantitatives de la vitesse d'évolution. Les vitesses d'évolution ainsi obtenues, bien que probablement sous-estimées, permettent néanmoins de comparer les différents traits et de discuter concrètement les implications sur l'évolution des traits phénotypiques.

La mise en œuvre des deux approches (génétique quantitative in-situ et SEMM) requiert de mesurer sur un grand nombre d'adultes la valeur individuelle des traits fonctionnels, les coordonnées spatiales ainsi que les génotypes. Par ailleurs, la mesure du gradient de sélection avec le SEMM requiert en plus d'échantillonner (non exhaustivement) une cohorte de semis, de les cartographier et de les génotyper. Idéalement, pour l'approche SEMM il faut échantillonner (localiser, génotyper, phénotyper) exhaustivement tous les adultes à l'intérieur d'une zone circonscrite.

Du fait du grand nombre d'individus que les deux types d'études impliquent, l'acquisition de ces données demande beaucoup de temps et peut se révéler très coûteuse. Cependant, l'avantage majeur est que les deux approches sont très complémentaires, à la fois dans les résultats qu'elles

produisent et dans les données qu'elles requièrent. En effet, elles nécessitent des données communes et en particulier, les données phénotypiques sont utilisées pour répondre à l'ensemble des questions. Chaque approche peut être utilisée indépendamment, mais une fois que l'une est initiée, la mise en œuvre de l'autre nécessite alors moins d'effort et d'investissement.

Comparativement à des études de jardin commun qui sont classiquement utilisées pour traiter des questions d'évolution et qui requièrent des données de phénotypage ainsi qu'un l'entretien des dispositifs, les approches in-situ requièrent un effort majeur d'acquisition de données de génotypage ce qui augmente l'effort d'expérimentation et n'est pas toujours possible selon les espèces. Cependant, comme nous l'avons évoqué, les études de génétique quantitative en milieu naturel sont complémentaires des études en jardin commun et l'acquisition de données de marqueurs moléculaires prévalant à leur mise en œuvre, le gain d'information est que ces techniques peuvent apporter n'est pas à négliger.

2) Évolution de la population étudiée

Comme nous l'avons vu, l'évolution des traits phénotypiques dans une population dépend de l'intensité de la sélection, de la variabilité génétique ainsi que de la part qu'elle représente dans l'expression du phénotype ou, en d'autres termes, de son héritabilité. Dans la partie précédente, nous avons discuté des méthodes employées pour évaluer ces différentes composantes. Dans cette partie nous discutons les résultats obtenus afin d'émettre des hypothèses sur l'évolution future de la population étudiée.

2.1 Valeur adaptative et mécanismes évolutifs

Nous avons mis en œuvre deux approches différentes pour estimer les gradients de sélection, toutes deux basées sur la régression d'indicateurs de la fitness sur la valeur des traits fonctionnels. Dans le chapitre 2, nous avons notamment mesuré l'effet des traits fonctionnels sur deux indicateurs de la composante reproductive de la fitness : la production de graines en terme de recouvrement du houppier (quantité ; approche I par observation sur l'adulte reproducteur) et du poids moyen des graines (qualité ; approche I). Nous considérons qu'à ce stade les mesures intègrent les effets sélectifs pré-recrutement (pré-zygotiques + post-zygotiques). Dans le chapitre 5, nous avons également mesuré l'effet des traits fonctionnels sur un autre indicateur de la fitness, le succès reproducteur

réalisé au stade semis de l'année (approche II par observation des semis réalisés). A ce stade, nous considérons que les mesures intègrent à la fois les effets sélectifs pré-recrutement et post-recrutement, même si d'autres processus sélectifs entreront en action avant le stade adulte. Pour certains traits fonctionnels, les deux approches donnent des résultats contrastés : l'effet positif du $\delta^{13}\text{C}$ sur le succès reproducteur (approche II) est en contradiction avec son effet négatif sur le poids des graines (approche I) ce qui s'explique probablement par l'effet d'une autre variable que le poids sur le succès reproducteur.

En revanche, pour d'autres traits, les résultats des deux approches convergent : l'effet positif d'une phénologie végétative précoce est démontré par les deux approches et c'est probablement l'avantage en termes de nombre de graines produites qui conduit à un meilleur succès reproducteur des individus ayant débourré plus tôt. L'effet de la masse foliaire est également démontré par les deux approches : les individus ayant de faibles masses foliaires ont une production plus importante de graines, des graines plus grosses et ont également un meilleur succès reproducteur.

De manière intéressante, alors que l'effet de la quantité d'azote ressort nettement à la fois sur le poids des graines et sur le recouvrement du houppier, un effet faible et non significatif est observé sur le succès reproducteur au stade semis. Une hypothèse est que la sélection sur la quantité des graines et sur le poids des graines se compensent pour aboutir à une absence d'effet net sur le succès reproducteur. On peut finalement noter que la différence de patron de sélection mise en évidence avec les approches I et II peut également être due à la sélection opérant pendant le recrutement des semis. Cependant, pour que l'effet de la sélection sur les traits des semis soit observable sur ceux des parents, il faut qu'à la fois le gradient de sélection et la base génétique du trait soient élevés.

Dans le chapitre 2, nous avons mesuré l'effet des traits fonctionnels sur un autre indicateur de la fitness, la croissance, qui est un trait très intégrateur de la performance de l'arbre et probablement déterminé par les mêmes facteurs que la production de graines, mais également par ceux qui déterminent la survie, les deux types de mécanismes n'impliquant pas nécessairement les mêmes facteurs. Dans le cas où la survie a un effet sur la fitness (ce qui est très probablement le cas), l'analyse de la croissance peut donc apporter des informations complémentaires sur la fitness des individus. Ainsi dans la suite de la discussion, on considère que l'évolution des traits ne dépend que des processus de sélection qui ont conduit à la cohorte de semis observée, c'est-à-dire incluant les processus de sélection pré-recrutement et post-recrutement.

Parallèlement à la population étudiée en détail dans cette thèse (placette N1, ~900 m d'altitude) nous avons échantillonné à ~1200m d'altitude (placette N2) et à ~1400m d'altitude (placette N4), respectivement 20 et 21 individus pour lesquels nous avons mesuré les mêmes traits foliaires morphologiques et physiologiques :

	N1	N2	N4	p_{value}
Effectif	149	20	20	-
Altitude	1000m	1150m	1400m	-
LMA (gC/m^2)	93.5	85.5	85.1	<<<0.001
LA (cm^2)	8.77	10.22	10.91	<<<0.001
LM (g)	81.88	87.10	92.50	0.12
N_{mass}	2.23	2.00	2.31	<<<0.001
$\delta^{13}\text{C}$	-27.34	-27.59	-27.70	0.03
SW_{mean}	158.20	138.70	124.40	<<<0.001
LWC	55.60	56.48	55.92	0.43

Tableau 4 : Evolution des moyennes phénotypiques des traits fonctionnels (liste, voir 'liste des abréviations', le long d'un gradient altitudinal sur la face nord du Mont Ventoux. La significativité de différence des moyennes a été testée avec une ANOVA, celle qui diffèrent étant indiquées en gras.

On observe que la placette N1 se démarque nettement des placettes N2 et N4, la placette N2 étant par ailleurs spatialement beaucoup plus proche de la placette N1. En outre, Gaüzère (2011) a mis en évidence en dispositif de jardin commun une différenciation phénotypique pour la phénologie du débournement entre la placette N1 et les deux autres placettes, les différences entre placettes N2 et N4 n'étant par ailleurs pas significatives. Il semble que la placette N1 présente donc une réponse particulière aux contraintes climatiques qui s'y exercent ce qui expliquerait la forte différenciation phénotypique des traits éco-physiologiques et morphologiques suggérant une forte valeur adaptative de ces traits.

L'effet du gradient altitudinal a probablement joué un rôle important sur la trajectoire évolutive passée de cette population comme le dénote la différenciation génétique observée pour la phénologie du débournement. Par ailleurs, la forte sélection observée ici est en accord avec les résultats obtenus concernant la croissance du hêtre sur le Ventoux. En effet, des baisses de croissance importantes ont été constatées sur la période 2000-2006 au niveau altitudinal de la population que nous avons étudiée conjointement à une baisse des précipitations et à une augmentation des températures (Cailleret & Davi 2010). Il est probable que l'augmentation des contraintes hydriques se fasse ressentir de manière particulièrement forte en marge ou les conditions

étaient déjà limitantes par le passé d'où l'impact négatif sur la croissance, ainsi que la forte sélection s'appliquant sur les traits permettant l'adaptation à ces contraintes observée dans cette thèse.

2.2) Évolution future de la population étudiée

Dans cette thèse, pour une partie des traits fonctionnels étudiés, nous avons mis en évidence une variance génétique / héritabilité significative ainsi que des effets adaptatifs à la fois concernant les traits de performance et le succès reproducteur. L'objectif de cette partie est de mettre en perspective ces différents résultats afin de répondre à la question générale de cette thèse, à savoir formuler un premier scénario pour la réponse adaptative de la population de hêtre au changement climatique. Pour cela nous appliquerons le modèle classique de prédiction de l'évolution d'un trait quantitatif sous sélection : l'équation du sélectionneur :

$$R = V_A \beta$$

Le taux d'évolution R pour un trait phénotypique est ici fonction de la variabilité génétique additive V_A et du gradient de sélection directionnel β .

Les valeurs des paramètres utilisées dans ce modèle (modèle univarié) sont :

- la base génétique de chaque trait phénotypique (héritabilité, variance) estimée dans le chapitre 3 ;
- l'intensité de la sélection directe sur chaque trait (cf modèle de régression multiple décrit au chapitre 1 ; ici, c'est l'estimation des gradients de sélection par le SEMM appliqué aux semis de l'année qui a fourni les estimations des paramètres d'intensité de la sélection (chapitre 5)

Ce modèle simple permet de mettre en perspective les estimations de paramètres génétiques pour élaborer un premier scénario de l'évolution future de la population étudiée. Un scénario plus juste pourrait être développé en prenant en compte l'effet des corrélations génétiques, ce qui pourra être fait dans un second temps en considérant l'ensemble de traits quantitatifs sous sélection et en utilisant l'équation du sélectionneur de type multivariée développée par Lande & Arnold (1983)

Tableau synthétisant les prédictions de l'évolution des traits sur une génération :

β_{SD} : le gradient de sélection standardisé (estimation, voir chapitre 5) ; h^2 l'héritabilité au sens strict (estimation, voir chapitre 3) ; M_P la moyenne phénotypique ; V_P la variance phénotypique ; R la réponse à la sélection ; R/σ_P la réponse à la sélection exprimée en unité d'écart-type phénotypique ; R/σ_A la réponse à la sélection exprimée en unité d'écart-type génétique :

	β_{SD}	h^2	M_P	V_P	R	R/σ_P	R/σ_A
PSS	0.65	0.27	46.93	27.77	0.75	0.14	0.27
LMA	0.19	0.02	97.71	215.80	0.04	0.003	0.02
LM	-0.56	0.22	0.27	0.07	-0.02	-0.06	-0.14
$\delta^{13}C$	0.69	0.29	-27.30	0.61	0.12	0.16	0.29
N_{mass}	-0.07	0.53	2.23	0.07	-0.01	-0.04	-0.05

Logiquement, la plus forte réponse à la sélection est prédite pour les traits de phénologie du débourrement (PSS) et de l'efficacité d'utilisation de l'eau ($\delta^{13}C$) qui sont les traits parmi les plus héréditaires et subissant la plus forte sélection. On remarque que la quantité d'azote (N_{mass}) qui est le trait de loin le plus héréditaire, présente un gradient de sélection très faible et évolue donc considérablement moins vite que PSS et $\delta^{13}C$. Cela illustre bien l'intérêt de rendre compte de l'évolution des traits en étudiant simultanément la base génétique des traits et le processus de sélection. La masse foliaire montre une réponse à la sélection intermédiaire, du fait d'une hérédibilité très légèrement inférieure à PSS et $\delta^{13}C$ et d'une sélection légèrement moins forte. Le LMA qui subit une sélection faible et montre une hérédibilité génétique très faible n'évolue quasiment pas.

À titre de référence, Conner (2001) avance une réponse moyenne à la sélection de 0.04 (en unité d'écart-type phénotypique) pour un trait ayant une hérédibilité de 0.25 et pour un gradient de sélection égal à 0.16 (ce qui correspond à la valeur de sélection médiane sur 63 études revues). Nous obtenons donc des taux d'évolution pour certains traits étudiés dans la population de hêtre très élevés comparativement à l'évolution moyenne attendue en population naturelle ; Ces taux d'évolution élevés sont dus aux fortes intensités de sélection estimées comparativement à la

distribution des gradients de sélection directionnels issue de la méta-analyse de Kingsolver *et al.* (2001). Ce résultat est en accord avec les conclusions issues des expériences de transplantations qui concluent à une capacité de répondre rapidement à la sélection chez les arbres (Savolainen *et al.* 2007).

Enfin, nos résultats suggèrent que, le fort potentiel évolutif observé dans la population de hêtre jouera un rôle non négligeable dans sa réponse au changement climatique et dans l'atténuation du fardeau de décalage (lag-load). Cependant, il reste encore à savoir si la population possède les capacités de se régénérer et de maintenir une taille de population viable. Ainsi Kinnison & Hairston (2007) recommandent d'approfondir la démarche que nous avons suivie de prédiction de l'évolution de la valeur des traits phénotypiques avec des analyses de type eco-évolutives, c'est-à-dire d'évaluer l'interaction entre la démographie, les valeurs génétiques et le contexte écologique.

Comme nous l'avons évoqué, un ensemble d'indices indique que la placette N1 a probablement expérimenté et expérimente toujours des conditions climatiques particulièrement contraignantes comparées au reste du gradient. La théorie du sauvetage évolutif (evolutionary rescue, Gomulkiewicz & Holt 1995) prédit une trajectoire évolutive contre-intuitive dans ces conditions. Une expérience emblématique récente menée par Bell & Gonzales (2012) démontre que ce sont les populations qui ont expérimenté les conditions de sélection les plus drastiques qui montrent un potentiel évolutif supérieur dans un environnement qui se dégrade. Nos résultats tendent à soutenir l'hypothèse d'un potentiel adaptatif élevé en condition de stress hydrique, pour une population ayant déjà expérimenté des pressions de sélection fortes pour cette variable environnementale.

Dans notre cas, la capacité de la population à maintenir un potentiel adaptatif élevé peut notamment s'expliquer par des fluctuations de la sélection due au climat, les années de sélection particulièrement sèches ayant permis de retenir une fraction de variabilité génétique favorable pour l'adaptation à des contraintes hydriques, alors que les années plus favorables auraient permis de retenir une variabilité génétique favorable pour d'autres contraintes. Il sera intéressant de tester si la population étudiée en N1 se distingue significativement du reste du gradient en termes de potentiel adaptatif aux contraintes hydriques, conformément à la théorie d'un potentiel adaptatif supérieur des populations ayant déjà expérimenté des conditions contraignantes. Dans son étude en jardin commun de descendances maternelles issues des placettes N1, N2, N4, Gaüzère (2011) observe une variabilité génétique plus élevée en N1 pour la phénologie du débourrement que sur le reste du gradient, ce qui corrobore cette hypothèse.

Du fait de la variabilité temporelle potentielle du processus de sélection, ces résultats mériteraient d'être approfondis en effectuant des mesures de la sélection pour d'autres épisodes de reproduction.

Par exemple, les individus qui débourent précocement en 2009 ont une meilleure fitness. Cela est probablement dû à un effet conjoint du faible impact des gelées tardives et à la réduction de la saison de végétation pour les individus tardifs due aux sécheresses estivales. Cependant, pour d'autres années, il n'est pas évident que ces facteurs jouent le même rôle, et cette variabilité inter-annuelle peut contribuer à une évolution directionnelle moins forte ou potentiellement inversée et donc au maintien de la diversité génétique.

Ce constat est également valable pour les traits morphologiques et physiologiques ; on peut imaginer qu'une année où les conditions d'alimentation en eau seraient différentes, les patrons de sélection différeraient également. Une perspective majeure de cette étude serait d'évaluer le succès reproducteur en lien avec le climat de l'année étudiée et d'en observer la variabilité inter-annuelle. Cependant, les épisodes de masting chez le hêtre ayant une fréquence très irrégulière, cela peut s'avérer en pratique très difficile à mettre en œuvre. Par ailleurs, l'évolution directionnelle du climat étant a priori plus importante dans le futur et à l'échelle d'une génération de hêtre que ses fluctuations inter-annuelles, la sélection devrait plutôt s'intensifier que s'inverser. Cependant du fait du caractère non linéaire de la sélection naturelle, cela reste à démontrer.

Notre étude apporte également une conclusion contre-intuitive concernant le rôle des flux de gènes sur la trajectoire évolutive des populations et en particulier sur l'évolution de la phénologie du débourrement. En effet, la placette étudiée débourent plus tard en environnement commun que les placettes situées plus haut sur le gradient (placettes N2 et N4 ; Gaüzere 2011). A priori donc, étant donné que la sélection s'exerce à présent sur cette placette de façon à favoriser les individus précoces, les flux de gènes en provenance de la partie supérieure du gradient seraient favorables et iraient dans le même sens que la sélection.

Mais pour que les flux de gènes favorisent l'action de la sélection, il faut (1) qu'ils soient suffisamment forts, et (2) qu'il n'y ait pas d'autres effets sélectifs antagonistes. Concernant le premier point, le pollen est considéré chez le hêtre comme le principal vecteur des flux de gène à longue distance. Cependant, nous obtenons des distances moyennes de dispersion efficace estimées relativement faibles (~30m) et des courbes de dispersion à queue légère (voir chapitre 4), ce qui plaide pour une dispersion du pollen majoritairement sur de courtes échelles spatiales. En revanche malgré les faibles distances de dispersion moyenne des graines, la courbe présente souvent des queues relativement lourdes.

Il est donc probable que les flux de gènes le long du gradient seront à la fois assurés par le pollen et les graines, leur efficacité à homogénéiser les pools de gènes le long du gradient restant à démontrer du fait d'une dispersion probablement restreinte. Le deuxième point peut s'avérer être

particulièrement complexe à étudier. Si l'initiation du débourrement dépend non seulement des températures, mais aussi de la disponibilité en eau (ce que nos résultats tendent à indiquer), il est possible que les gènes provenant du haut du gradient (où le stress hydrique est moins marqué) aient des effets plus complexes. Concernant les autres traits qui participent à l'adaptation au manque d'eau, il est possible que les allèles pré-adaptés se situent en bas du gradient, ainsi les flux de gènes auront potentiellement des effets antagonistes sur l'adaptation de la population étudiée. Il reste à déterminer pour les autres traits étudiés comment se structure la variabilité génétique le long du gradient, ce qui permettra de mieux comprendre les interactions entre flux de gènes et sélection (thèse de Julie Gaüzere en cours).

3) Potentiel évolutif des traits fonctionnels foliaires chez les arbres

Dans cette thèse, nous avons évalué le potentiel évolutif d'une population de hêtre en considérant des traits fonctionnels foliaires habituellement décrits comme permettant l'adaptation à des contraintes climatiques et plus particulièrement aux contraintes hydriques. Dans cette section nous mettrons nos résultats en perspective avec ceux de la littérature, afin de juger de leur signification dans le contexte plus général des capacités d'adaptation du hêtre et plus généralement des arbres au climat.

La phénologie du débourrement : dans cette thèse nous avons mis en évidence un fort potentiel évolutif de ce trait en lien avec une forte valeur d'héritabilité, ainsi qu'une force de la sélection directionnelle élevée. Le fort potentiel évolutif estimé est en accord avec les résultats de jardin commun qui démontrent souvent une forte différenciation génétique de ce caractère entre populations d'arbres (Savolainen *et al.* 2007; Alberto *et al.* 2011; Kremer *et al.* 2012) et chez le hêtre en particulier (Teissier du Cros et Thiebaut 1988, Vitasse *et al.* 2010). Par exemple, Vitasse *et al.* (2010) montrent chez une population de hêtre des Pyrénées qu'en environnement commun, les individus provenant d'altitudes élevées débourrent plus tôt que les individus d'altitudes basses. Ils concluent que, du fait de flux de gènes probablement élevés au sein du gradient et d'une population établie depuis peu (4000 ans), il y a une forte sélection directionnelle pour ce trait. La phénologie du débourrement est connue pour avoir un rôle majeur dans l'assimilation annuelle totale de carbone et donc d'avoir un effet important sur la fitness des individus (Chuine & Beaubien 2001). La sélection

opère a priori en réduisant les mauvais calages phénologiques sur les fluctuations environnementales.

Typiquement, le rôle des gelées tardives est souvent évoqué comme nuisant aux individus précoces en endommageant les bourgeons. La population que l'on étudie est par ailleurs en condition de stress hydrique, et le stress peut favoriser les individus tardifs qui limitent l'épuisement de leurs ressources. Une hypothèse alternative lorsque le stress hydrique est important pendant la période estivale (comme en région méditerranéenne) est que l'initiation précoce de la saison de végétation permet d'augmenter la période de végétation avant l'occurrence du stress hydrique estival et ainsi de compenser la diminution de la photosynthèse associée à cette période. Le fait que les individus précoces soient sélectionnés tend à soutenir cette hypothèse, et confirme des résultats obtenus par simulation (Oddou-Muratorio et Davi 2011).

Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les pressions de sélection sont probablement en train de changer et notamment nous soupçonnons que le rôle des gelées tardives comme contraintes sur les individus précoces est en train de disparaître, la sélection observée est donc peut être due à un relâchement des pressions de sélection. Cependant, comme nous l'avons évoqué, il faudrait vérifier que ce patron de sélection soit valable pour d'autres épisodes de reproduction. Dans ce cas, la présence de sécheresse estivale peut jouer un rôle de renforcement de la valeur sélective des individus précoces.

Les traits physiologiques : Concernant tout d'abord le $\delta^{13}\text{C}$, tout comme la phénologie du débourrement, le fort potentiel évolutif corrobore les résultats de jardin commun qui tendent à démontrer une différenciation phénotypique marquée pour ce trait (Brendel 2012). Cependant, ces expériences échouent parfois à mettre en évidence la valeur adaptative du $\delta^{13}\text{C}$ comme c'est le cas dans l'étude de Ramirez-Valiente *et al.* (2009) qui tout en démontrant une héritabilité significative pour ce caractère n'a pas permis de mettre en évidence une différenciation significative entre des populations espagnoles de chênes liège, groupées en fonction du niveau de stress hydrique expérimenté. Il semble que ces tests soient affectés par le haut niveau de diversité génétique intra-populationnelle (mais voir Lamy *et al.* 2011). Notre étude apporte la preuve que le $\delta^{13}\text{C}$ peut subir une forte sélection directionnelle.

Il est difficile de certifier que la sélection observée est due au contexte hydrique, il aurait fallu pour cela soit mesurer l'adaptation dans un environnement moins contraint pour vérifier que les patrons de sélection observés sont spécifiques du milieu étudié, soit caractériser la disponibilité en eau pour

les individus étudiés afin de vérifier directement le lien entre la ressource en eau et les patrons de sélection observés.

Nos résultats suggèrent évolution vers une efficacité d'utilisation de l'eau plus forte dans la population N1, ce qui suggère, quelque soit l'origine de cette réponse (plastique et/ou génétique), une adaptation en cours à un stress hydrique plus fort. La diversité génétique est significative, malgré la forte plasticité attendue pour ce caractère. L'hypothèse d'une faible plasticité du fait d'un environnement peu variable est peu plausible, Nourtier *et al.* (2012) ayant démontré une forte hétérogénéité à micro-échelle de la disponibilité en eau sur le Ventoux et le $\delta^{13}\text{C}$ est connu pour être sensible à ce paramètre. Ainsi, la variabilité génétique est probablement conséquente, ce qui corrobore les résultats obtenus chez Ramirez-Valiente *et al.* (2009). Il serait intéressant de vérifier la constance des pressions de sélection entre année et au cours du recrutement ce qui pourrait avoir un impact sur le maintien d'une forte diversité génétique.

Concernant la quantité d'azote foliaire (N_{mass}) peu d'études se sont pour le moment intéressées au potentiel évolutif de ce trait. Bresson *et al.* (2012) ne parviennent pas à mettre en évidence une différenciation génétique significative pour N_{mass} entre populations de hêtre le long d'un gradient, alors que en jardin commun, N_{mass} tend à augmenter avec l'altitude d'origine de la population. En revanche Ramirez-Valiente *et al.* (2009) observent une différenciation de ce trait en lien avec le contexte hydrique des populations d'origine. Nous n'observons pas de sélection pour ce trait, mais si ce trait est sous sélection alors son évolution du fait de la forte base génétique observée peu se faire très rapidement.

Les traits morphologiques : Dans la méta-analyse de Geber et Griffen (2003), les traits morphologiques apparaissent comme étant peu héréditaires ($h^2_{\text{moy}} \sim 0.22$). Dans notre population, le LMA apparaît comme étant principalement plastique. Dans leur étude sur le chêne liège, Ramirez-Valiente *et al.* (2009) observent une variation du LMA intra-population principalement plastique et, sur le hêtre, Bresson *et al.* (2011) observent également des variations du LMA dus principalement à des effets environnementaux. Dans notre étude, du fait de la plasticité considérable du LMA, ce trait présente un faible potentiel évolutif. Or, Ramirez-Valiente *et al.* (2009) observent une différenciation écotypique du LMA malgré la faible hérédibilité. Cela est également le cas dans une étude d'Agrawal *et al.* (2008). Ces études tendent à indiquer que le potentiel évolutif du LMA bien que faible est probablement non nul.

Nous observons une forte différenciation phénotypique du LMA le long du gradient, avec un LMA qui décroît quand l'altitude augmente. Cette différenciation est a priori majoritairement due au caractère plastique de ce trait. Cependant, il est possible que toute la variation génétique pour ce caractère soit structurée le long du gradient du fait de la sélection si les valeurs observées aux différents niveaux correspondent à des optimums différents de la N1 (voir Tableau 4). La thèse en cours de Julie Gaüzère devrait permettre de répondre à cette question.

Par ailleurs, le LMA est en fait le rapport de la taille des feuilles sur leur poids sec, ainsi il est possible qu'une sélection complexe sur ces traits conduise à une différenciation génétique du LMA entre les différents niveaux du gradient même si, localement, il est impossible d'observer de la variabilité génétique du LMA. Ainsi la taille des feuilles semble être plus héritable que le LMA, même si les valeurs sont non significatives, et le poids de feuilles quant à lui est héritable. Sur la placette étudiée la taille des feuilles diffère considérablement des autres placettes. Une taille réduite des feuilles est considérée comme étant une adaptation au manque d'eau du fait d'une surface d'échange moindre et donc moins de pertes en eau.

Adaptation multitrait :

Un aspect également important que nous avons abordé dans cette thèse est l'interconnexion de l'effet des traits sur la performance des individus, ce phénomène ayant déjà été mis en évidence par plusieurs études sur la valeur sélective des traits écophysologiques. Nous montrons l'existence de deux syndrômes de traits fonctionnels : un syndrome dit « dispendieux en eau » et un syndrome dit « économe en eau ». L'existence de ces syndrômes et d'une sélection sur les corrélations entre traits pourraient avoir des conséquences importantes sur le potentiel évolutif de la population (non pris en compte par le modèle uni varié que nous avons appliqué précédemment).

Les réponses à la sélection observées pour chacun des traits peuvent en particulier résulter dans une réponse globale beaucoup plus forte au niveau de la fitness du fait des effets d'interactions entre traits. En particulier, du fait de la forte fécondité des arbres, il serait intéressant de voir si les syndrômes bien adaptés peuvent promouvoir une forte fécondité et ainsi limiter les impacts négatifs d'une forte sélection directionnelle. Par ailleurs, le modèle de prédiction que nous avons utilisé ne permet de faire des inférences que sur l'évolution directionnelle des traits quantitatifs. Cependant, il serait intéressant d'évaluer la capacité de la sélection corrélée à maintenir de la diversité génétique au sein des populations ainsi qu'à créer des corrélations génétique par le filtrage des combinaisons de trait les plus adaptées.

Le fort potentiel adaptatif mis en évidence pour cette population qui se trouve être à double titre une population de marge chaude (sur l'aire de répartition du hêtre et sur le gradient étudié) illustre bien l'hypothèse de réserve de variabilité génétiques que sont les populations de marges chaudes pour promouvoir l'adaptation aux futurs changements climatiques.

Bibliographie

Bibliographie

Agrawal A.A., Erwin A.C., and Cook S.C. (2008) Natural selection on and predicted responses of ecophysiological traits of swamp milkweed (*Asclepias incarnata*). *Journal of Ecology*, **96**, 536-542.

Agrawal A.A., and Stinchcombe J.R. (2009) How much do genetic covariances alter the rate of adaptation? *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences*, **276**, 1183-1191.

Alberto F., Ramirez-Valiente J., Valladares F., Delgado Huertas A., Granados S., and Aranda I. (2011) Factors affecting cork oak growth under dry conditions: local adaptation and contrasting additive genetic variance within populations. *Tree Genetics and Genomes*, **7**, 285-295.

Alberto F., Bouffier L., Louvet J.M., Lamy J.B., Delzon S., and Kremer A. (2011) Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *Journal of Evolutionary Biology*, **24**, 1442-1454.

Alleaume-Benharira M., Pen I., and Ronce O. (2006) Geographical patterns of adaptation within a species' range: interactions between drift and gene flow. *Journal Of Evolutionary Biology*, **19**, 203-215.

Andrew R.L., Peakall R., Wallis I.R., Wood J.T., Knight E.J., and Foley W.J. (2005) Marker-based quantitative genetics in the wild?: The heritability and genetic correlation of chemical defenses in eucalyptus. *Genetics*, **171**, 1989-1998.

Ashley M.V. (2010) Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA microsatellites have altered the landscape. *Critical Reviews In Plant Sciences*, **29**, 148-161.

Asuka Y., Tani N., Tsumura Y., and Tomaru N. (2004) Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 101-103.

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

Bell G. (2010) Fluctuating selection: the perpetual renewal of adaptation in variable environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-biological Sciences*, **365**, 87-97.

Berteaux D., Reale D., McAdam A.G., and Boutin S. (2004) Keeping pace with fast climate change: Can arctic life count on evolution?. *Integrative and Comparative Biology*, **44**, 140-151.

Blouin M.S. (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **18**, 503-511.

Blows M.W., and Hoffmann A.A. (2005) A reassessment of genetic limits to evolutionary change. *Ecology*, **86**, 1371-1384.

Bouvet J.M., Kelly B., Sanou H., and Allal F. (2008) Comparison of marker- and pedigree-based methods for estimating heritability in an agroforestry population of *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn. (shea tree). *Genetic Resources and Crop Evolution*, **55**, 1291-1301.

- Breda N., Huc R., Granier A., and Dreyer E. (2006) Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals Of Forest Science*, **63**, 625-644.
- Brendel O. (2012) Diversité génétique de l'efficience d'utilisation de l'eau chez les arbres forestiers. Diplôme d'habilitation à diriger des recherches (HDR). Université de Lorraine. 52p.
- Bresson C.C., Vitasse Y., Kremer A., and Delzon S. (2011) To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech?. *Tree Physiology*, **31**, 1164-1174.
- Bridle J.R., and Vines T.H. (2007) Limits to evolution at range margins: when and why does adaptation fail? *TRENDS in Ecology and Evolution*, **22**, 140-147.
- Burczyk J., Adams W.T., Moran G.F., & Griffin A.R. (2002) Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighborhood model. *Molecular Ecology*, **11**, 2379-2391.
- Burczyk J., Adams W.T., Birkes D.S., and Chybicki I.J. (2006) Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. *Genetics Society of America*, **173**, 363-372.
- Burger R., and Lynch M. (1995) Evolution and extinction in a changing environment - a quantitative-genetic analysis. *Evolution*, **49**, 151-163.
- Cailleret M., Davi H. (2011). Effects of climate on diameter growth of co-occurring *Fagus sylvatica* and *Abies alba* along an altitudinal gradient. *Trees - Structure and Function*, **25**, 265-276
- Cailleret M, Nourtier M, Amm, A, Gillmann M, Chanzy A, Davi H. Comparison of drought-induced decline and mortality processes on silver fir among three sites. Submitted to *Annals of Forest Science*
- Charmantier A., and Garant D. (2005) Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences*, **272**, 1415-1425.
- Charmantier A., McCleery R.H., Cole L.R., Perrins C., Kruuk L.E.B., and Sheldon B.C. (2008) Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science*, **320**, 800-803.
- Chuine I., and Beaubien E.G. (2001) Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecology Letters*, **4**, 500-510.
- Ciais, P., Reichstein, M., Viovy, N. *et al.* (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, **437**, 529-533.
- Clark J.S., Silman M., Kern R., Macklin E., and HilleRisLambers J. (1999) Seed dispersal near and far: Patterns across temperate and tropical forests. *Ecology*, **80**, 1475-1494.
- Cochard H., Breda N., and Granier A. (1996) Whole tree hydraulic conductance and water loss regulation in *Quercus* during drought: evidence for stomatal control of embolism? *Annals of Forest Science*, **53**, 197-206.

- Coltman D.W. (2005) Testing marker-based estimates of heritability in the wild. *Molecular Ecology*, **14**, 2593-2599.
- Conner J.K. (2001) How strong is natural selection?. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **16**, 215-217.
- Conner J.K., Franks R., and Stewart C. (2003) Expression of additive genetic variances and covariances for wild radish floral traits: Comparison between field and greenhouse environments. *Evolution*, **57**, 487-495.
- Conner J.K., Karoly K., Stewart C., Koelling V.A., Sahli H.F., and Shaw F.H. (2011) Rapid independent trait evolution despite a strong pleiotropic genetic correlation. *American Naturalist*, **178**, 429-441.
- Conner J.K. (2012) Quantitative genetic approaches to evolutionary constraint: how useful? *Evolution*, **66**, 3313-3320.
- Damesin C., Rambal S., and Joffre R. (1998) Seasonal and annual changes in leaf delta C-13 in two co-occurring Mediterranean oaks: relations to leaf growth and drought progression. *Functional Ecology*, **12**, 778-785.
- Davi H., Dufrêne E., Francois C, le Maire G., Loustau D., Bosc A., Rambal S, Granier E. Moors. (2006). Sensitivity of water and carbon fluxes to climate changes from 1960 to 2100 in European forest ecosystems. *Agricultural and Forest Meteorology*, **141**, 35-56
- Davis M.B., and Shaw R.G. (2001) Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change. *Science*, **292**, 673-679.
- Davis M.B., Shaw R.G., and Etterson J.R. (2005) Evolutionary responses to changing climate. *Ecology*, **86**, 1704-1714.
- Dawson T.E., Mambelli S., Plamboeck A.H., Templer P.H., and Tu K.P. (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 507-559.
- Delph L.F., Steven J.C., Anderson I.A., Herlihy C.R., and Brodie Edmund D.I. (2011) Elimination of a genetic correlation between the sexes via artificial correlational selection. *Evolution*, **65**, 2872-2880.
- Donovan L.A., and Ehleringer J.R. (1994) Potential for selection on plants for water-use efficiency as estimated by carbon isotope discrimination. *American Journal of Botany*, **81**, 927-935.
- Donovan L.A., Ludwig F., Rosenthal D.M., Rieseberg L.H., and Dudley S.A. (2009) Phenotypic selection on leaf ecophysiological traits in Helianthus. *New Phytologist*, **183**, 868-879.
- Donovan L.A., Maherali H., Caruso C.M., Huber H., and de Kroon H. (2011) The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **26**, 88-95.
- Dudley S.A. (1996) Differing selection on plant physiological traits in response to environmental water availability: A test of adaptive hypotheses. *Evolution*, **50**, 92-102.
- Edelaar P., Burraco P., and Gomez-Mestre I. (2011) Comparisons between QST and FST: how wrong have we been? *Molecular Ecology*, **20**, 4830-4839.

- Ehleringer J.R. (1993) Variation in leaf carbon-isotope discrimination in *Encelia farinosa* - implications for growth, competition, and drought survival. *Oecologia*, **95**, 340-346.
- Endler J.A. (1986) Natural selection in the wild. *Princeton University Press*, 336p.
- Etterson J.R., and Shaw R.G. (2001) Constraint to adaptive evolution in response to global warming. *Science*, **294**, 151-154.
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R., and Hubick K.T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, 503–537.
- Fisher R.A. (1918) The correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance the correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance. *Philosophical Transaction of the Royal of Edinburgh*, **52**, 399-433.
- Franks S.J. (2011) Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*. *New Phytologist*, **190**, 249-257.
- Futuyma D.J. (2010) Evolutionary constraint and ecological consequences. *Evolution*, **64**, 1865-1884.
- Gallais A. (1990) Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson, Paris, 588p.
- Gauzère J. (2011) Effet de la dispersion du pollen à longue distance sur les capacités d'adaptation de populations de hêtre commun sur un gradient altitudinal. Master 2 Recherche – Biologie Géosciences Agroressources Environnement, Université Montpellier II, Montpellier Supagro, Montpellier.
- Gay L, Siol M. and Ronfort J. Pedigree-free estimates of heritability in the wild: promising prospects for selfing populations. Submitted to JEB
- Geber M.A., and Griffen L.R. (2003) Inheritance and natural selection on functional traits. *International Journal of Plant Sciences*, **164**, S21-S42.
- Guende G. (1978) Sensibilité des milieux et impacts des activités humaines sur le massif du Ventoux. *La Terre et la Vie*, suppl 1 (Mycologist du Mont Ventoux), 39-66.
- GIEC (2007) : *Bilan 2007 des changements climatiques. Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat [Équipe de rédaction principale, Pachauri, R.K. et Reisinger, A.]*. GIEC, Genève, Suisse, 103 pages.
- Gienapp P., Teplitsky C., Alho J.S., Mills J.A., and Merila J. (2008) Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, **17**, 167-178.
- Gomulkiewicz R. & Holt R.D. (1995) When does evolution by natural selection prevent extinction? *Evolution*, **49**, 201-207.
- Granier A., Reichstein M., Bréda N., Janssens I.A., Falge E., Ciais P., Grunwald T., Aubinet M., Berbigier P., Bernhofer C., Buchmann N., Facini O., Grassi G., Heinesch B., Ilvesniemi H., Keronen P., Knohl A., Kostner B., Lagergren F., Lindroth A., Longdoz B., Loustau D., Mateus J., Montagnani L., Nys C., Moors E., Papale D., Peiffer M., Pilegaard K., Pita G., Pumpanen J., Rambal S., Rebmann C., Rodrigues A.,

- Seufert G., Tenhunen J., Vesala I., Wang Q., (2007). Evidence for soil water control on carbon and water dynamics in European forests during the extremely dry year: 2003. *Agricultural and Forest Meteorology*, **143**, 123–145.
- Hampe A., and Petit R.J. (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*, **8**, 461-467.
- Hansen M.M., Olivieri I., Waller D.M., and Nielsen E.E. (2012) Monitoring adaptive genetic responses to environmental change. *Molecular Ecology*, **21**, 1311-1329.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W, and Sherman-Broyles S. (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, **6**, 95-124.
- Hendry A.P., and Kinnison M.T. (1999) Perspective: the pace of modern life: measuring rates of contemporary microevolution. *Evolution*, **53**, 1637-1653.
- Hoffmann A.A., and Merila J. (1999) Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **14**, 96-101.
- Hoffmann W.A., Marchin R.M., Abit P., and Lau O.L. (2011) Hydraulic failure and tree dieback are associated with high wood density in a temperate forest under extreme drought. *Global Change Biology*, **17**, 2731-2742.
- Jacquart A. (1968) Liaison génétique entre individus apparentés. *Population*, **1**, 93-128.
- Jensen T.S. (1985) Seed-seed predator interactions of european beech, *Fagus sylvatica* and forest rodents, *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus flavicollis*. *Oikos*, **44**, 149-156.
- Jost L. (2008) GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**, 4015-4026.
- Kingsolver J.G., Hoekstra H.E., Hoekstra J.M., Berrigan D., Vignieri S.N., Hill C.E., Hoang A., Gibert P., and Beerli P. (2001) The strength of phenotypic selection in natural populations. *American Naturalist*, **157**, 245-261.
- Koerner C., and Basler D. (2010) Phenology under global warming. *Science*, **327**, 1461-1462.
- Kramer K., Buiteveld J., Forstreuter M., Geburek T., Leonardi S., Menozzi P., Povillon F., Schelhaas M., du Cros E.T., Vendramin G.G., and van der Werf D.C. (2008) Bridging the gap between ecophysiological and genetic knowledge to assess the adaptive potential of European beech. *Ecological Modelling*, **216**, 333-353.
- Kremer A., Ronce O., Robledo-Arnuncio J.J., Guillaume F., Bohrer G., Nathan R., Bridle J.R., Gomulkiewicz R., Klein E.K., Ritland K., Kuparinen A., Gerber S., and Schueler S. (2012) Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology Letters*, **15**, 378-392.
- Kuparinen A., Savolainen O., & Schurr F.M. (2010) Increased mortality can promote evolutionary adaptation of forest trees to climate change. *Forest Ecology and Management*, **259**, 1003-1008.
- Lamy J.-B., Bouffier L., Burlett R., Plomion C., Cochard H., and Delzon S. (2011) Uniform Selection as a Primary Force Reducing Population Genetic Differentiation of Cavitation Resistance across a Species Range. *Plos One*, **6**, e23476.

- Lande R., and Arnold S.J. (1983) The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, **37**, 1210-1226.
- Lander T.A., Oddou-Muratorio S., Prouillet-Leplat H., and Klein E.K. (2011) Reconstruction of a beech population bottleneck using archival demographic information and Bayesian analysis of genetic data. *Molecular Ecology*, **20**, 5182-5196.
- Lechowicz M.J. (1984) Why Do Temperate Deciduous Trees Leaf Out At Different Times - Adaptation and Ecology of Forest Communities. *American Naturalist*, **124**, 821-842.
- Lenormand T. (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **17**, 183-189.
- Le Rouzic A. and Carlborg O. (2007) Evolutionary potential of hidden genetic variation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **23**, 33-37.
- Loarie S.R., Duffy P.B., Hamilton H., Asner G.P., Field C.B., and Ackerly D.D. (2009) The velocity of climate change. *Nature*, **462**, 1052-U111.
- Lynch M., and Walsh B. (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer, 980p.
- Maad J. (2000) Phenotypic selection in hawkmoth-pollinated *platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. *Evolution*, **54**, 112-123.
- Maherali H., Moura C.F., Caldeira M.C., Willson C.J., Jackson R.B. (2005) Functional coordination between leaf gas exchange and vulnerability to xylem cavitation in temperate forest trees. *Plant Cell and Environment*, **26**, 571-583.
- McDowell N., Pockman W.T., Allen C.D., Breshears D.D., Cobb N., Kolb T., Plaut J., Sperry J., West A., Williams D.G., and Yezzer E.A. (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. *New Phytologist*, **178**, 719-739.
- Meagher T.R. (1991) Analysis of paternity within a natural-population of *Chamaelirium luteum*.2. Patterns of male reproductive success. *American Naturalist*, **137**, 738-752.
- Meinzer F.C., Johnson D.M., Lachenbruch B., McCulloh K.A., and Woodruff D.R. (2009) Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology*, **23**, 922-930.
- Merila J., Kruuk L.E.B., and Sheldon B.C. (2001) Cryptic evolution in a wild bird population. *Nature*, **412**, 76-79.
- Michelot A., Bréda N., Damesin C., Dufrêne E. (2012) Differing growth responses to climatic variations and soil water deficits of *Fagus sylvatica*, *Quercus petraea* and *Pinus sylvestris* in a temperate forest. *Forest Ecology and Management*, **265**, 161-171.
- Misson L., Degueldre D., Collin C., Rodriguez R., Rocheteau A., Ourcival J.M., and Rambal S. (2011) Phenological responses to extreme droughts in a Mediterranean forest. *Global Change Biology*, **17**, 1036-1048.

- Morgan M.T., and Conner J.K. (2001) Using genetic markers to directly estimate male selection gradients. *Evolution*, **55**, 272-281.
- Morrissey M.B., Kruuk L.E.B., and Wilson A.J. (2010) The danger of applying the breeder's equation in observational studies of natural populations. *Journal of Evolutionary Biology*, **23**, 2277-2288.
- Nathan R., Horvitz N., He Y., Kuparinen A., Schurr F.M., and Katul G.G. (2011) Spread of North American wind-dispersed trees in future environments. *Ecology Letters*, **14**, 211-219.
- Nathan R., Klein E.K., Robledo-Arnuncio J.R., Revilla E. (2012) Dispersal Kernels: Review (Chapitre 5) dans 'Dispersal Ecology and Evolution'. Oxford University Press. 496p.
- Nielsen P. & Shaffalitzky de Muckadell M. (1954) Flower observations and controlled pollinations in *Fagus*. *Silvae Genetica*, **3**, 6-17.
- Nilsson S.G. (1985) Ecological and evolutionary interactions between reproduction of beech *Fagus sylvatica* and seed eating animals. *Oikos*, **44**, 157-164.
- Nourtier M., Chanzy A., Cailleret M., Yingge X., Huc R., and Davi H. (2012) Transpiration of silver Fir (*Abies alba* mill.) during and after drought in relation to soil properties in a Mediterranean mountain area. *Annals of Forest Science*, en ligne.
- Oddou-Muratorio S., and Klein E.K. (2008) Comparing direct vs. indirect estimates of gene flow within a population of a scattered tree species. *Molecular Ecology*, **17**, 2743-2754.
- Oddou-Muratorio S., Klein E.K., and Austerlitz F. (2005) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. II. Pollen dispersal and heterogeneity in mating success inferred from parent-offspring analysis. *Molecular Ecology*, **14**, 4441-4452.
- Oddou-Muratorio S. & Davi H. (2011) Mechanisms of local adaptations to climatic gradients: lessons from a Physio-Demo-Genetics Model. In 12th EEF Congress "Responding to rapid environmental change", Avila, Spain.
- Ozgul A., Tuljapurkar S., Benton T.G., Pemberton J.M., Clutton-Brock T.H., and Coulson T. (2008) The dynamics of phenotypic change and the shrinking sheep of St. Kilda. *Science*, **325**, 464-467.
- Pastorelli R., Smulders M.J.M., Van't Westende W.P.C., Vosman B., Giannini R., Vettori C., and Vendramin G.G. (2003) Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky RID B-3654-2009. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 76-78.
- Petit R.J., and Hampe A. (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **37**, 187-214.
- Piotti A., Leonardi S., Buiteveld J., Geburek T., Gerber S., Kramer K., Vettori C., & Vendramin G.G. (2012) Comparison of pollen gene flow among four European beech (*Fagus sylvatica* L.) populations characterized by different management regimes. *Heredity*, **108**, 322-331.
- Postma E., and van Noordwijk A.J. (2005) Gene flow maintains a large genetic difference in clutch size at a small spatial scale. *Science*, **433**, 65-68.
- Price G.R. (1970) Selection and covariance. *Nature*, **227**, 520-521.

- Rambal S., Ourcival J.M., Joffre R., Mouillot F., Nouvellon Y., Reichstein M., and Rocheteau A. (2003) Drought controls over conductance and assimilation of a Mediterranean evergreen ecosystem: scaling from leaf to canopy. *Global Change Biology*, **9**, 1813-1824.
- Ramirez-Valiente A.J., Sanchez-Gomez D., Aranda I., and Valladares F. (2010) Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiology*, **30**, 618-627.
- Ramirez-Valiente J.A., Lorenzo Z., Soto A., Valladares F., Gil L., and Aranda I. (2009) Elucidating the role of genetic drift and natural selection in cork oak differentiation regarding drought tolerance. *Molecular Ecology*, **18**, 3803-3815.
- Rauscher M.D. (1992) The measurement of selection on quantitative traits - biases due to environmental covariances between traits and fitness. *Evolution*, **46**, 616-626.
- Rehfeldt G.E., Tchebakova N.M., Parfenova Y.I., Wykoff W.R., Kuzmina N.A., and Milyutin L.I. (2002) Intraspecific responses to climate in *Pinus sylvestris*. *Global Change Biology*, **8**, 912-929.
- Reznick D.N., and Ghalambor C.K. (2001) The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica*, **112**, 183-198.
- Ritland K. (1996) Marker-based method for inferences about quantitative inheritance in natural populations. *Evolution*, **50**, 1062-1073.
- Ritland K. (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology*, **9**, 1195-1204.
- Robledo-Arnuncio J.J. (2011) Wind pollination over mesoscale distances: an investigation with Scots pine. *New Phytologist*, **190**, 222-233.
- Roussel M., Dreyer E., Montpied P., Le-Provost G., Guehl J.-M., and Brendel O. (2009) The diversity of C-13 isotope discrimination in a *Quercus robur* full-sib family is associated with differences in intrinsic water use efficiency, transpiration efficiency, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 2419-2431.
- Savolainen O., Pyhajarvi T., and Knurr T. (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review Of Ecology Evolution And Systematics*, **38**, 595-619.
- Silva D., Rezende Mazzella P., Legay M., Corcket E., Dupouey J.L. (2012) Does natural regeneration determine the limit of European beech distribution under climatic stress? *Forest Ecology and Management*, **266**, 263-272.
- Sinervo B., and Svensson E. (2002) Correlational selection and the evolution of genomic architecture. *Heredity*, **89**, 329-338.
- Smouse P.E., Meagher T.R., and Kobak C.J. (1999) Parentage analysis in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae): why do some males have higher reproductive contributions?. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 1069-1077.

- Stinchcombe J.R., Agrawal A.F., Hohenlohe P.A., Arnold S.J., and Blows M.W. (2008) Estimating nonlinear selection gradients using quadratic regression coefficients: double or nothing? *Evolution*, **69**, 2435–2440.
- Sykes M.T., Prentice I.C., & Cramer W. (1996) A bioclimatic model for the potential distributions of north european tree species under present and future climates. *Journal of Biogeography*, **23**, 203-233.
- Teissier du Cros E. & Thiebaut B. (1988) Variability in beech : budding, height growth and tree form. *Annals of Forest. Science.* **4**, 383-398.
- Thomas S.C., and Hill W.G. (2000) Estimating quantitative genetic parameters using sibships reconstructed from marker data. *Genetics*, **155**, 1961–1972.
- Van de Castele T., Galbusera P., and Matthysen E. (2001) A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, **10**, 1539-1549.
- Vekemans X., and Hardy O.J. (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, **13**, 921-935.
- Verrier E., Brabant P., and Gallais A. (2001) *Faits et concepts de base en génétique quantitative*. Polycopié INA Paris-Grignon, 134 p.
- Violle C., Navas M.L., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I., and Garnier E. (2007) Let the concept of trait be functional! *Oikos*, **116**, 882-892.
- Vitasse Y., Bresson C.C., Kremer A., Michalet R., and Delzon S. (2010) Quantifying phenological plasticity to temperature in two temperate tree species. *Functional Ecology*, **24**, 1211-1218.
- Voltas J., Regina Chambel M., Aranzazu Prada M., and Pedro Ferrio J. (2008) Climate-related variability in carbon and oxygen stable isotopes among populations of Aleppo pine grown in common-garden tests. *Trees-structure and Function*, **22**, 759-769.
- Von Wuehlisch G., Von Krusche D., & Muhs H.J. (1995) Variation in temperature sum requirement for flushing of beech provenances. *Silva Genetica*, **44**, 5-6
- Von Wuehlisch G. (2008) EUFORGEN technical guidelines for genetic conservation and use for European beech (*Fagus sylvatica*). Biodiversity International, Rome, Italy, 6p.
- Wade M.J., and Kalisz S. (1990) The causes of natural selection. *Evolution*, **44**, 1947-1955.
- Weir B.S., Anderson A.D., and Hepler A.B. (2006) Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics*, **7**, 771-780.
- Whitlock M.C. (2008) Evolutionary inference from QST. *Molecular Ecology*, **17**, 1885-1896.
- Whitlock M.C. (2011) G'ST and D do not replace FST. *Molecular Ecology*, **20**, 1083-1091.
- Wolkovich E.M., Cook B.I., Allen J.M., Crimmins T.M., Betancourt J.L., Travers S.E., Pau S., Regetz J., Davies T.J., Kraft N.J.B., Ault T.R., Bolmgren K., Mazer S.J., McCabe G.J., McGill B.J., Parmesan C.,

Salamin N., Schwartz M.D., and Cleland E.E. (2012) Warming experiments underpredict plant phenological responses to climate change. *Nature*, **485**, 494-497.

Wright I.J., Reich P.B., Westoby M., Ackerly D.D., Baruch Z., Bongers F., Cavender-Bares J., Chapin T., Cornelissen J.H.C., Diemer M., Flexas J., Garnier E., Groom P.K., Gulias J., Hikosaka K., Lamont B.B., Lee T., Lee W., Lusk C., Midgley J.J., Navas M.L., Niinemets U., Oleksyn J., Osada N., Poorter H., Poot P., Prior L., Pyankov V.I., Roumet C., Thomas S.C., Tjoelker M.G., Veneklaas E.J., and Villar R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821-827.

Wright I.J., Westoby M., and Reich P.B. (2002) Convergence towards higher leaf mass per area in dry and nutrient-poor habitats has different consequences for leaf life span. *Journal of Ecology*, **90**, 534-543.

Remerciements

Pour commencer, je remercie tout le monde! Comme cela, je n'oublierai effectivement personne ! Mais comme il est possible que les gens qui ont contribué effectivement à faire que ma thèse aie pu se finir sans (trop !) d'encombres, aient envie d'avoir un peu plus de crédit de ma part (et que par ailleurs, je sais bien que les remerciements c'est ce qu'il y a de plus rigolo à lire !) ... je vais quand même développer !!!

Tout d'abord et en tout premier lieu, je dois te remercier Sylvie. Parce que tu m'as fait confiance et tu m'as confié ce projet dingue qu'est une thèse (si, si, voir figure plus bas !). Alors, merci, merci à toi Sylvie, pour m'avoir donné l'occasion de réaliser cela. Grâce à toi, j'ai énormément appris, scientifiquement parlant, évidemment, mais pas seulement. Tu as su me rattraper et me remettre en selle quand il le fallait. Merci pour m'avoir fait autant progresser !

Je remercie aussi François Lefèvre, qui en plus de ses multiples fonctions de directeur de l'URFM et autre, a pris le temps de me conseiller à de multiples reprises sur l'ensemble de cette thèse. Merci à vous François pour votre immense curiosité à toute épreuve, parfois un peu débordante pour moi et que vous perdiez de temps en temps, en cours de route. Globalement, vos conseils auront été super enrichissants ! Et merci à Bruno, mon directeur pour ses super sacoches et pour avoir apporté encore plus de conseils avisés !

Je remercie Hendrik, le viking de l'URFM, grâce à qui ma thèse a pris la couleur qu'elle a actuellement, merci pour avoir fait la boussole régulièrement ! Je remercie Étienne (tiens un autre grand au labo !) pour m'avoir appris tout plein de trucs ! Je remercie Philippe Rozenberg et Léopoldo Sanchez pour m'avoir accueilli si gentiment à Orléans !

Je remercie les gars de terrain, merci pour leur bonne humeur et les bonnes blagues, merci à Anthony, Fred, Olivier, Norbert et Franck (je précise d'ailleurs que Olivier est un raconteur de blague hors pair, dans la pure tradition du sud, trempées dans le pastis !) Et un gros merci à Frédéric Millier l'orléanais, la gentillesse même.

Je tiens aussi à remercier d'autres scientifiques avec qui j'ai interagi sur la science, mais pas que ! Alors merci à Thomas qui sait tout faire (de la science, être papa, de la musique !), merci à Roland qui est si gentil et abordable et tout et tout ! Et merci aussi à Jean-Claude !

Et maintenant, je vais remercier les copains, qui m'ont permis d'assouvir mes tendances naturelles à la procrastination, mais grâce à qui j'ai pu rire beaucoup (et fort apparemment !) et c'était vraiment cool !... Donc je remercie les vieux de la vieille (ça leur fera pas plaisir, mais pour les rassurer une petite libanaise (une vraie sal!!!) m'a gentiment remarqué que je me faisais vieille !) : tout d'abord, je remercie Cyrille et Gwen, les mecs du bureau, sérial blagueurs, m'ayant parfois pris pour cible, merci à vous les mecs, c'était de la balle ! Je remercie aussi Annabelle la ragoteuse, Annabelle la cinéphile, Annabelle la nana qui détonne ! Merci aussi à la chère et tendre de Gwen, Florence. Je remercie Gaëlle qui était là au début de mon stage et qui m'a donné pleins de bons conseils ! Je remercie monsieur Max, grand dendrologue de son état ! Et aussi Clem la magnifique ! Pareil pour Alice et son cher et tendre Gaël (une normande et un breton, où a-t-on vu ça!) grâce à qui j'ai découvert la Guadeloupe. Je remercie Hélène, la suédoise de Marseille.

Je remercie les copains d'Orléans, un énorme merci à Max, je crois que j'ai récolté quelques rides du bonheur à force d'avoir ri, merci pour le canap bien plus sympa que l'auberge de jeunesse (rappelles toi du pommeau de douche !). Je remercie Anne-Sophie et Sara, les nanas de la dream team orléanaise !

Et à présent, les petits jeunes d'Avignon ! Je remercie en duo, Céline et Guillaume (ils étaient dans le même bureau...), merci pour le fun... et je remercie Pierrot alias Pierre Panteix ! Je remercie Jojo l'immense Jurassien (tu savais que Franky Vincent habite à Dole ? Pas que des consanguins dans le Jura en fait !), pour sa grande ouverture d'esprit et son humour mordant, mais aussi pour les points musicaux. Je remercie Wiliam, toujours dans l'outerspace, mais fondamentalement sympa ! Je remercie l'autre Jojo, l'autre ragoteur du labo. Je remercie l'autre Alice, la petite, tout aussi exubérante que la première ! Je remercie beaucoup, beaucoup les fumeuses, Marie et Anne-So pour leur gentillesse et tout pleins d'échanges bien funs ! Et pour finir, je remercie la petite bande de nana, Juju, Marion (dite aussi Minus !) fraîchement mariée, MJ la libanaise (qui heureusement, n'est pas qu'une saloperie !), on attend de fêter ton mariage à Chypre (haha !), Cindy, Marianne (ah la Gwada!) et aussi Hadrien (désolée je te case dans la bande !), grâce à vous les derniers mois de panique furent aussi des mois de fun.

Je remercie Mers, c'était vraiment super d'être ta coloc', ô toi, grande buveuse de bière devant l'éternel ! Merci pour les longues discussions, pour les randos et les rigolades, merci, merci !!!

Juste comme ça pour rire, merci à ceux que je connaîtrais jamais, à tous les musicos (thomas excepté), grâce à qui le casque vissé sur les oreilles, les difficultés de la thèse se sont un peu adoucies.

Je remercie les copines de master de Massilia, on a fait qu'un an ensemble, mais j'ai eu la chance de continuer un peu avec vous. D'abord Swanni la super colombienne, hola, chiquita bonnita ! Encore une fois, chu contente que ta directrice t'ait repérée en Colombie, grâce à toi, la bonne humeur latino et une grande gentillesse aussi, se sont invitées chez nous ! Merci à Mel, grâce à qui j'ai eu des conversations hyper-intéressantes, les psychorigides de la recherche ont perdu beaucoup de choses quand tu as décidé de faire prof, mais tu auras beaucoup de choses à offrir à tes petits monstres (et vive les cerises !). Et enfin Elsa. L'artiste Elsa, la copine de voyage devant l'éternel, on en a encore beaucoup d'autres à faire, tu sais ? En attendant, en mars, c'est Mumford & Co, youpi ! Gros bisous à vous les nanas !

Je remercie Julie et Nathalie, les copines d'avant, avant tout ! Merci à vous les nanas, une grosse partie du chemin que j'ai fait, je vous le dois ! Je vous revoie bientôt en Lot-et-Garonne !

Et maintenant c'est presque la fin, alors je dois absolument remercier mes petites sœurs. Qu'est ce que je serais devenue si vous n'aviez pas existé, vous avez été mon soutien inconditionnel, celles qui m'ont toujours le plus compris. Le monde de la science vous paraît certes loin, mais vous avez su m'épauler et être là pour moi à tout moment. Vous z'êtes les meilleures les filles, ok ?!

Et pour finir, je remercie Manu, car même si tu es arrivé un peu tard, tu es arrivé à temps. Tu m'as offert des lendemains tout doux. Merci beaucoup pour ton soutien et pour toutes ces bonnes choses ! Un gros, que dis-je ? Un immense merci !!!

... To be continued !



Figure euuuh?!