



HAL
open science

Stratégie mère porteuse chez *Cupressus dupreziana* A. Camus (cyprès du Tassili). Analyse, conséquences et perspectives

Juana Laura Rivera Nava

► To cite this version:

Juana Laura Rivera Nava. Stratégie mère porteuse chez *Cupressus dupreziana* A. Camus (cyprès du Tassili). Analyse, conséquences et perspectives. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paul Cézanne (Aix Marseille 3), 2008. Français. NNT: . tel-02824782

HAL Id: tel-02824782

<https://hal.inrae.fr/tel-02824782>

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Paul Cézanne – Aix Marseille III
Faculté de Sciences et Techniques
Spécialité : Biologie de Populations, Écologie

Stratégie Mère Porteuse chez *Cupressus dupreziana* A. Camus (cyprès du Tassili) – Analyse, conséquences et perspectives

Par

Juana Laura RIVERA NAVA

Soutenue : le 04 juillet 2008 devant le Jury composé de :

Nathalie FRASCARIA-LACOSTE	Maître de conférences – AgroParisTech	Rapporteur
Philippe LABEL	Directeur de Recherche – INRA d'Orléans	Rapporteur
Thierry GAUQUELIN	Professeur – IMEP, UMR CNRS – IRD 6116	Examineur
Michel CALLEJA	Ingénieur de Recherche – Montpellier SupAgro	Examineur
Christian PICHOT	Chargé de Recherche – INRA d'Avignon	Directeur de thèse
Bruno FADY	Directeur de Recherche – INRA d'Avignon	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Merci Père pour ton soutien jour après jour.

Merci Jésus pour ton amour et ta fidélité incomparables.

Merci à mes sœurs et frères pour le soutien et encouragement.

Merci à ma famille et à toutes mes amitiés pour les encouragements à cette aventure.

Je remercie au Conseil National de Science et Technologie (CONACYT) de mon pays, le Mexique, pour la bourse qui m'a été donné afin de réaliser mes études de doctorat. Ce soutien financier a été indispensable à la réalisation de cette thèse.

Merci aux membres du Jury et du comité de thèse (Daniel Prat, Alain Palloix, Frédéric Médail), pour l'évaluation du travail.

Je remercie Christian Pichot (INRA d'Avignon) pour le encadrement, l'aide, le soutien et l'encouragement apporté pour la réalisation de ce travail, ses remarques constructives, sa patiente et sa gentillesse.

Merci Bruno Fady pour la Co-Direction de la thèse.

Merci à l'INRF d'Alger, à Fatiha Abdoun, au Jardin Botanique de Montpellier et à la pépinière Rey de Carpentras, pour la donation des semences et des échantillons de cyprès du Tassili.

Merci à Patrice Brahic et le personnel de la pépinière Les Milles pour l'élevage des cyprès.

Merci à Thierry Lamant et Catherine Ducatillion pour l'information sur les ressources de *Cupressus dupreziana* en France (*ex-situ*).

Un grand merci à Sylvie Sabatier, Patrick Heuret, Mohamed El Maâtaoui et Giovanni G. Vendramin, pour les travaux ensemble, ses contributions et encouragements pour la thèse.

Merci à Bruno Jouaud, Jean Thévenet, William Bruneto, Anne Roig, Christel Laguerre, Thierry Langlois, et aux collègues de Biologie Moléculaire de l'INRA-St Maurice, pour leur aide et contributions à ce travail.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à l'ensemble de l'Unité de Recherches Écologie des Forêts Méditerranéennes (URFM) de l'INRA d'Avignon.

AVANT PROPOS

Chez les plantes et les animaux supérieurs l'embryon se forme généralement à partir de la fusion des gamètes mâle et femelle, bien que parfois il se développe seulement à partir de cellules femelles (parthénogenèse ou apomixie). Chez les plantes, la production d'un embryon à partir de cellules mâles se développant sur une mère porteuse (apomixie paternelle) a été décrite pour la première fois par Pichot *et al.* (2001) chez un gymnosperme méditerranéen : *Cupressus dupreziana* A. Camus ou cyprès du Tassili. La capacité embryogénique du pollen diploïde de cette espèce a été démontrée dans le cadre de pollinisation interspécifique (*C. sempervirens* L. x *C. dupreziana*). Elle permet le développement de l'embryon sans fécondation en se nourrissant des tissus d'une mère porteuse.

Ce résultat extraordinaire, au sens littéral du terme, soulève de nombreuses questions tant sur la nature des aptitudes « mère porteuse » et « embryogénique » des gamétophytes femelles et mâles, que sur l'origine et les conséquences évolutives d'une reproduction par apomixie paternelle.

Dans ce contexte le présent travail poursuit la caractérisation de ce système de reproduction en précisant d'une part « l'aptitude mère porteuse » du cyprès du Tassili grâce à l'analyse de descendances issues de pollinisations libres ou contrôlées, et en étudiant d'autre part les conséquences de ce système sur la diversité génétique de l'espèce.

La première partie de l'étude nous permettra de démontrer l'aptitude du cyprès du Tassili à produire, à partir de pollen haploïde d'un autre cyprès méditerranéen *C. sempervirens*, des cyprès présentant un fort intérêt cognitif ou appliqué. La deuxième partie permettra quant à elle, de confronter la diversité génétique observée et sa structuration aux attendus pour une reproduction par apomixie paternelle et d'interpréter ces résultats dans le cadre de l'évolution de l'espèce.

Afin d'assurer une bonne valorisation des travaux, ce mémoire de thèse est construit autour de 3 publications scientifiques et est organisé en 4 chapitres. Le chapitre 1, bibliographique, est dédié à la reproduction sexuée chez les plantes supérieures, et aux cyprès, surtout les méditerranéens. Le chapitre 2, divisé en cinq parties, porte sur la caractérisation des cyprès issus de mère *C. dupreziana* présentes dans l'aire naturelle ou en collection dans le sud-est de la France. Le chapitre 3 traite des ressources génétiques chez *C. dupreziana*, au travers d'un inventaire et de l'analyse de la diversité en utilisant des marqueurs moléculaires. Enfin, le chapitre 4 est consacré à la discussion générale.

Stratégie Mère Porteuse chez *Cupressus dupreziana* A. Camus (cyprès du Tassili) – Analyse, conséquence et perspectives

La reproduction par apomixie paternelle a été mise en évidence chez une des espèces ligneuses les plus menacées du monde, le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus, 233 individus dans l'aire naturelle), originaire du plateau du Tassili N'Ajjer en Algérie.

Les descendances issues de graines de *C. dupreziana* récoltées dans l'aire naturelle ou en collection dans le sud-est de la France ont été caractérisées pour leur morphologie, leur niveau de ploïdie, leur génotype microsatellite nucléaire, la production et la viabilité des cônes mâles, la croissance et la phyllotaxie. Environ 50% des descendants issus de pollinisation libre de *C. dupreziana ex-situ* sont des cyprès du Tassili. Les autres descendants sont des cyprès verts, *C. sempervirens*, soit haploïdes soit diploïdes, ces derniers étant le plus souvent homozygotes. Les individus haploïdes proviennent d'une androgénèse *in planta* à partir du pollen haploïde du cyprès vert. Ils se caractérisent par un allongement faible, des entre-nœuds très courts et un passage plus rapide de la phyllotaxie verticillée par 4 à celle verticillée par 3 et par 2. Les individus diploïdes homozygotes seraient issus d'une haplo-diploïdisation spontanée ou de la fusion de deux gamètes mâles. Leur déficit de vigueur est moins prononcé. Ces cyprès verts androgénétiques expriment aussi des anomalies de microsporogénèse et sont de bons candidats pour la sélection de variétés non pollinisantes. L'analyse de la diversité génétique chez *C. dupreziana* met en évidence une très faible diversité entre arbres et une très forte hétérozygotie individuelle. Ce résultat inhabituel chez une espèce menacée est révélateur d'une reproduction par apomixie. Le cyprès du Tassili est une espèce en sursis.

Mots clés : Espèce menacée, apomixie, androgénèse *in planta*, haploïde, microsporogénèse, diversité génétique

Surrogate mother strategy in *Cupressus dupreziana* A. Camus (Tassili cypress) – Analysis, consequences and perspectives

Paternal apomixis was demonstrated in one of the most endangered woody species in the world, Tassili cypress (*Cupressus dupreziana* A. Camus, 233 individuals in the natural area), which originates from Tassili N'Ajjer plateau in Algeria.

Offspring produced by *C. dupreziana* seeds harvested from the natural area or from collections in south eastern France were characterized by their morphology, their ploidy level, their nuclear microsatellite genotype, the production and viability of their male cones, their growth and phyllotaxy. Approximately 50% of progeny from *ex-situ* open-pollinated *C. dupreziana* were Tassili cypress. The other half were common cypress (*C. sempervirens*) seedlings, either haploid or diploid, the latter being most often homozygous. Haploid individuals were produced by *in planta* androgenesis from haploid pollen of common cypress. They were characterized by a weak elongation, very short internodes and an earlier switch from whorled phyllotaxy 4 to whorled phyllotaxy 3 and 2. The more vigorous diploid homozygous individuals probably derive either from a spontaneous haplo-diploidisation or from the fusion of two male gametes. These androgenic common cypress individuals also expressed microsporogenesis anomalies and are good candidates for the selection of pollen-free varieties. The genetic diversity analysis in *C. dupreziana* showed a very weak diversity among trees and a very strong individual heterozygosity. This unusual result for an endangered species is indicative of reproduction by apomixis. The Tassili cypress is living on borrowed time.

Key words: Endangered species, apomixis, androgenesis *in planta*, haploid, microsporogenesis, genetic diversity

Sommaire

AVANT PROPOS	3
RÉSUMÉ	4
CHAPITRE 1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA REPRODUCTION SEXUÉE ET SUR LES CUPRESSACÉES	9
1.1 Reproduction sexuée et apomixie	9
1.1.1 Reproduction sexuée chez les plantes supérieures	9
1.1.1.1 Angiospermes	9
1.1.1.2 Gymnospermes	11
1.1.2 Reproduction par apomixie	13
1.1.2.1 Apomixie classique ou « maternelle »	13
1.1.2.2 Apomixie paternelle	14
1.1.2.3 Avantages et inconvénients de l'apomixie	15
1.2 Les Cupressacées	16
1.2.1 Le genre <i>Cupressus</i>	17
1.2.1.1 Classification générale	17
1.2.1.2 Taxonomie proposée des cyprès	19
1.2.2 Les cyprès méditerranéens	21
1.2.3 L'espèce <i>Cupressus sempervirens</i> Linnaeus (1753)	22
1.2.3.1 Description et écologie	22
1.2.3.2 Remarques taxonomiques	23
1.2.4 L'espèce <i>Cupressus atlantica</i> Gaussen (1950)	23
1.2.5 L'espèce <i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus (1926)	24
1.2.5.1 Description et écologie	24
1.2.5.2 Biologie de la reproduction	27
1.2.5.3 Distribution des cyprès dans l'aire naturelle et en collections	27

CHAPITRE 2. CARACTÉRISATION DES CYPRÈS ISSUS DE « MÈRES » <i>Cupressus dupreziana</i> A. CAMUS	29
2.1 Matériel végétal	29
2.1.1 Arbres mères et récoltes de graines	29
2.1.2 Semis des années 2000 et 2001	29
2.1.3 Bouturage et greffage	30
2.1.4 Semis de l'année 2005	31
2.1.5 Caractéristiques analysées et tests réalisés à partir du matériel végétal produit	33
2.2 Phénotypes et niveaux de ploïdie des plantules	34
2.2.1 Méthodologie	34
2.2.2 Analyse des cyprès <i>Cupressus sempervirens</i> obtenus à partir du semis 2000	36
Article 1 : « Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen. » Christian Pichot, Benjamin Liens, Juana L. Rivera Nava, Julien B. Bachelier and Mohamed El Maâtaoui. <i>Genetics</i> 2008, 178: 379 – 383.	37
2.2.3 Le cas d'un cyprès triploïde	42
2.2.4 Analyse des plantules issues des semis des années 2001 et 2005	43
2.2.5 Stabilité dans le temps du niveau de ploïdie des cyprès <i>C. sempervirens</i> haploïdes et test de doublement	47
2.2.6 Conclusion	48
2.3 Évaluation de l'homozygotie ou hétérozygotie des cyprès <i>C. sempervirens</i> diploïdes	50
2.3.1 Analyse avec des marqueurs nucléaires microsatellites	50
Article 2 : « Molecular evidence for natural production of homozygous <i>Cupressus sempervirens</i> L. lines by <i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus seed trees. » Juana L. Rivera Nava, Anna Buonamici, Giovanni G. Vendramin, Christian Pichot. Soumis à la revue <i>Heredity</i> .	51

2.3.2 Conclusion	62
2.4 Croissance et phyllotaxie des cyprès <i>C. sempervirens</i> haploïdes et diploïdes	63
2.4.1 Introduction	63
2.4.2 Matériel et méthodes	64
2.4.2.1 Matériel végétal	64
2.4.2.2 Caractères observés	66
2.4.2.3 Méthodes d'analyse	67
2.4.3 Résultats	67
2.4.3.1 La survie	67
2.4.3.2 La croissance	68
2.4.3.3 La phyllotaxie	71
2.4.4 Conclusion	72
2.5 Production de cônes mâles et microsporogenèse chez les cyprès <i>C. sempervirens</i> issus de « mères » <i>C. dupreziana</i>	74
2.5.1 Viabilité des cônes mâles et microsporogenèse chez deux cyprès <i>C. sempervirens</i> : l'un haploïde et l'autre homozygote	74
Article 3 :	
« Microsporogenesis and pollen development in haploid and homozygous <i>Cupressus sempervirens</i> genotypes produced by <i>C. dupreziana</i> seed trees. »	
Juana Laura Rivera Nava, Christian Pichot, Mohamed El Maâtaoui. Soumis à la revue Sexual Plant	
Reproduction.	75
2.5.2 Observations complémentaires	85
2.5.3 Conclusion	87
 CHAPITRE 3. RESSOURCES GÉNÉTIQUES CHEZ <i>Cupressus dupreziana</i> A. CAMUS	 88
3.1 Les ressources dans l'aire naturelle	88
3.2 Les ressources hors de l'aire naturelle	91

3.2.1 Le cyprès du Tassili en France	91
3.2.2 Le cyprès du Tassili dans les autres pays	93
3.2.3 Les pays ayant essayé de cultiver des <i>Cupressus dupreziana</i>	94
3.3 Diversité génétique de l'espèce	96
3.3.1 Matériel et méthode	96
3.3.2 Résultats	96
3.4 Interprétation évolutive et gestion des ressources	103
CHAPITRE 4. CONCLUSION GÉNÉRALE	108
BIBLIOGRAFIE	112
ANEXES	
Anexe 1	122
Anexe 2	127

CHAPITRE 1. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA REPRODUCTION SEXUÉE ET SUR LES CUPRESSACÉES

Ce chapitre bibliographique, est constitué de deux parties. Dans la première, on aborde les systèmes de reproduction chez les angiospermes et les gymnospermes en incluant la reproduction par apomixie. Dans la deuxième partie du chapitre on décrit les cyprès et leur classification sur la base des dernières propositions taxonomiques. Ensuite, on parle des espèces de cyprès méditerranéens et plus spécifiquement de leur écologie, des anomalies au niveau de la reproduction et des particularités de l'espèce *C. dupreziana*. Cette espèce présente un système de reproduction unique décrit comme « apomixie paternelle ».

1.1 Reproduction sexuée et apomixie

Les plantes se multiplient par reproduction sexuée et/ou propagation végétative. Dans la reproduction sexuée il y a une alternance des générations diploïdes et haploïdes (sporophytique et gamétophytique). L'embryon diploïde d'origine biparentale se développe à partir de la fécondation d'un gamète femelle haploïde par un gamète mâle haploïde et la fusion de leurs noyaux. Toutefois dans un certain nombre de cas l'embryon se forme sans fécondation de gamètes, à partir de cellules d'origine maternelle. Il s'agit de l'apomixie.

1.1.1 Reproduction sexuée chez les plantes supérieures

1.1.1.1 Angiospermes

Les organes reproducteurs chez les angiospermes se retrouvent dans la fleur. Les grains de pollen (à l'origine des gamètes mâles) se forment dans les anthères des étamines et les ovules dans l'ovaire des carpelles (Figure 1). Les sacs polliniques contiennent des cellules mères (diploïdes) qui par méiose forment les grains de pollen (haploïdes) (Figure 2a). L'ovule est couvert par des téguments et contient la cellule mère du sac embryonnaire qui subit une méiose et forme quatre cellules, dont subsiste seulement une qui évolue en sac embryonnaire, cellule avec huit noyaux (Figure 2b). Trois de ces noyaux se situent dans un pôle de la cellule

proche du micropyle, l'oosphère au centre et deux cellules adjacentes, les synergides. Trois autres se placent dans le pôle opposé et vont constituer les antipodes. Les deux autres noyaux, dénommés polaires, fusionnent au centre et forment un noyau diploïde (Demasly-Feller et Demasly-Feller 1990, Campbell et Reece 2004).

La reproduction (Figure 3) se déroule en trois étapes du fait de la position en profondeur de l'oosphère dans la cavité ovarienne. D'abord, a lieu la pollinisation au cours de laquelle le pollen est transféré vers le stigmate de la plante réceptrice, et sur lequel il est retenu. Le grain de pollen se divise pour donner deux spermatozoïdes non mobiles. Ensuite, le grain de pollen va germer en développant un tube pollinique, en favorisant la différenciation de deux spermatozoïdes, pour atteindre la paroi de l'ovaire. Finalement, au cours de la fécondation proprement dite, les gamètes engagés dans le tube pollinique, se déversent dans une des deux synergides pour aller dans le cytoplasme du sac embryonnaire. Un des spermatozoïdes s'unit avec l'oosphère pour donner, après plusieurs segmentations, l'embryon diploïde. L'autre s'unit aux deux noyaux polaires déjà fusionnés pour former, après plusieurs segmentations, l'endosperme triploïde (Demasly-Feller et Demasly-Feller 1990). Ces deux fusions simultanées constituent la double fécondation. L'embryon forme alors une graine, qui reste en dormance jusqu'à ce qu'elle soit transportée par le vent, par l'eau ou par les animaux vers un endroit propice à sa germination.

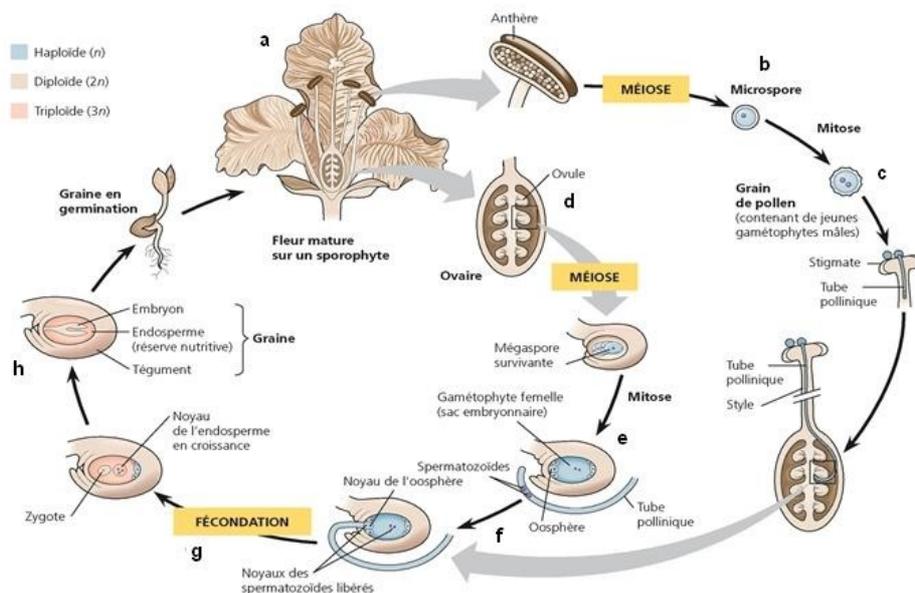


Figure 1. Cycle de développement d'une angiosperme. Les anthères de la fleur (a) produisent des microspores (b) qui deviennent des grains de pollen (c) contenant de jeunes gaméophytes mâles. Les ovules (d) produisent des mégaspores qui deviennent des gaméophytes femelles (sacs embryonnaires) (e). La pollinisation (f) réunit les gaméophytes dans l'ovaire. La double fécondation a lieu (g), et les zygotes (h) deviennent des embryons de sporophytes enveloppés dans des graines renfermant également une réserve nutritive. (Les tissus du fruit qui entourent

la graine ne sont pas représentés dans ce schéma); Lorsque la graine germe, l'embryon se développe et devient un sporophyte. (D'après Campbell et Reece 2004)

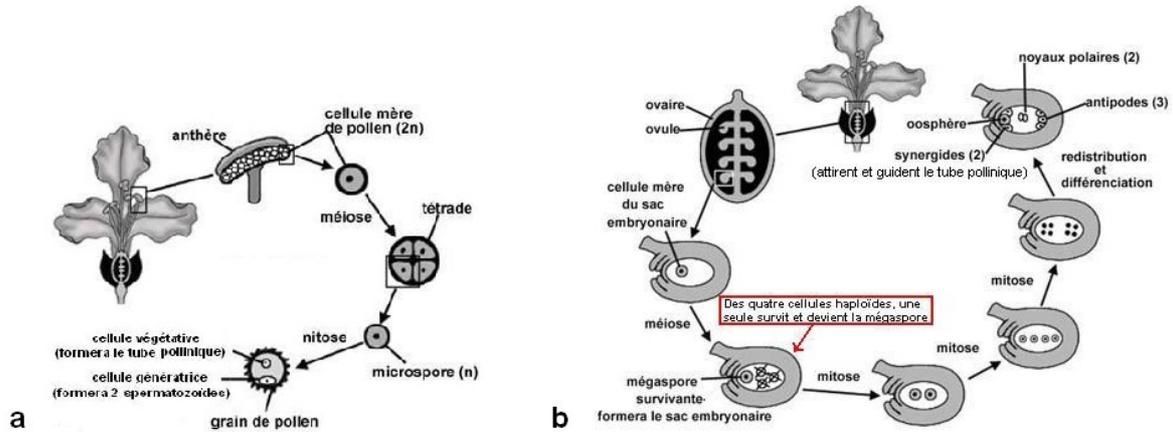


Figure 2. Formation de grains de pollen (a) et développement du sac embryonnaire (b) chez les angiospermes.

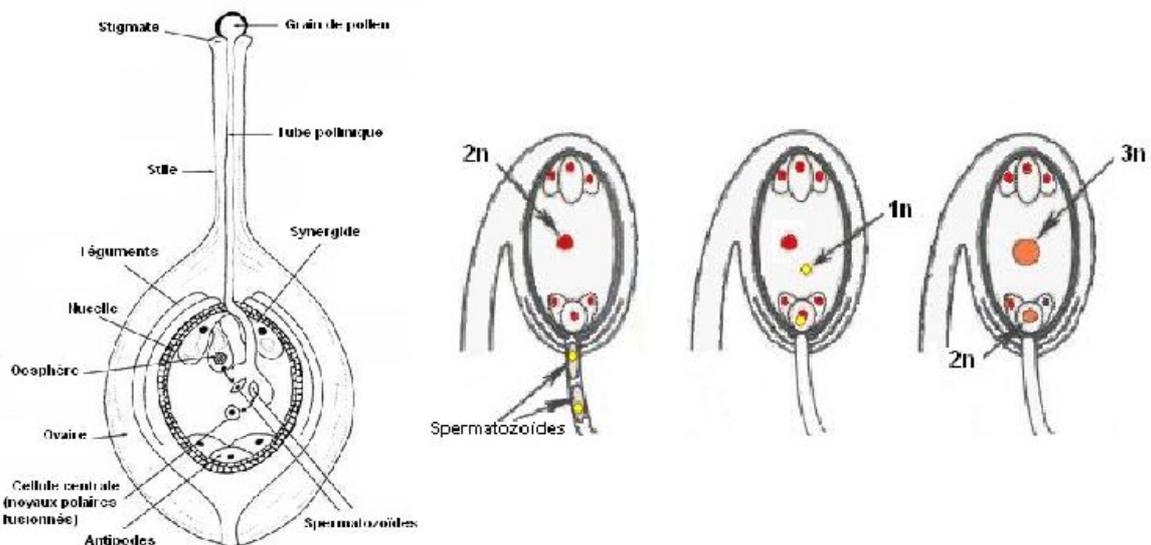


Figure 3. Détails de la pollinisation et de la double fécondation chez les angiospermes.

1.1.1.2 Gymnospermes

La plupart des gymnospermes sont des espèces monoïques, c'est à dire que les structures reproductrices mâles et femelles sont portées par un même individu. Les organes reproducteurs sont localisés au niveau des cônes (organes sexuels). Les cônes mâles produisent le pollen, tandis que les cônes femelles portent les ovules (Figure 4).

Les cônes mâles se comportent comme les étamines des angiospermes. Ils présentent de nombreuses écailles ou microsporophylles, portant les sacs polliniques. Ils contiennent le massif de cellules mères (diploïdes) de pollen, qui après avoir subi une méiose, forme quatre microspores haploïdes évoluant chacune en un grain de pollen. Ce grain de pollen est le siège d'une série de mitoses dans lesquelles le gamétophyte ou prothalle mâle donne lieu à quatre cellules : deux prothaliennes, une végétative et une anthéridiale. A partir de cette dernière, il faudra deux divisions pour produire les spermatozoïdes, contre une chez les angiospermes (Ozenda *et al.* 1982). Ce schéma décrit chez le pin, n'est pas celui de toutes les gymnospermes. En effet, chez le cyprès le pollen ne contient qu'une cellule avec un seul noyau (Pichot et El Maâtaoui 2000, El Maâtaoui et Pichot 2001).

Les cônes femelles sont constitués d'un axe duquel partent des écailles, dont chacune est soutenue à sa base par une petite feuille appelée bractée. Les écailles qui sont aussi nommés macrosporophyles portent les ovules. Elles sont pourvues d'un nucelle renfermant une cellule mère de mégaspores, qui par méiose donne quatre cellules haploïdes disposées en file (Sing 1978). Habituellement une seule de ces cellules persiste. Toutefois chez le cyprès vert (*C. sempervirens* L.) il a été montré que les quatre cellules persistent. Il s'agit alors de tétrasporie (El Maâtaoui *et al.* 1998). L'endosperme est habituellement haploïde car il est issu du développement du mégagamétophyte lui même ayant pour origine une des mégaspores produites lors de la méiose (Sing 1978). Cet endosperme se développe aux dépens du nucelle, se multiplie, se bourne de réserves et finit par occuper une grande partie de l'ovule, le nucelle ne persistant que sous forme d'un tissu très réduit. Des archéogones pluricellulaires vont se différencier dans ce tissu de réserve, comportant chacun un oosphère (gamète femelle), les cellules du canal du ventre et du col (Demasly-Feller et Demasly-Feller 1990).

Les grains de pollen élaborés dans les sacs polliniques des cônes mâles et transportés par le vent se déposent sur l'enveloppe protectrice de l'ovule (tégument), et pénètrent à l'intérieur de celui-ci par un orifice appelé micropyle (Campbell et Reece 2004). Ils atteignent alors le nucelle, sur laquelle ils germent, formant un tube pollinique. Un seul des gamètes mâles va féconder l'oosphère. Les suivants peuvent féconder d'autres oosphères d'archéogones voisins, ou dégénérer. Si plusieurs archéogones sont fécondés, seul un des zygotes engendrés se développera. Le zygote diploïde va se diviser par mitose immédiatement. L'embryon qui en résultera sera de structure identique à celui des angiospermes, seul le nombre de cotylédons varie (1 à 2 chez les angiospermes et de 2 à plusieurs chez les gymnospermes) (Demasly-Feller et Demasly-Feller 1990).

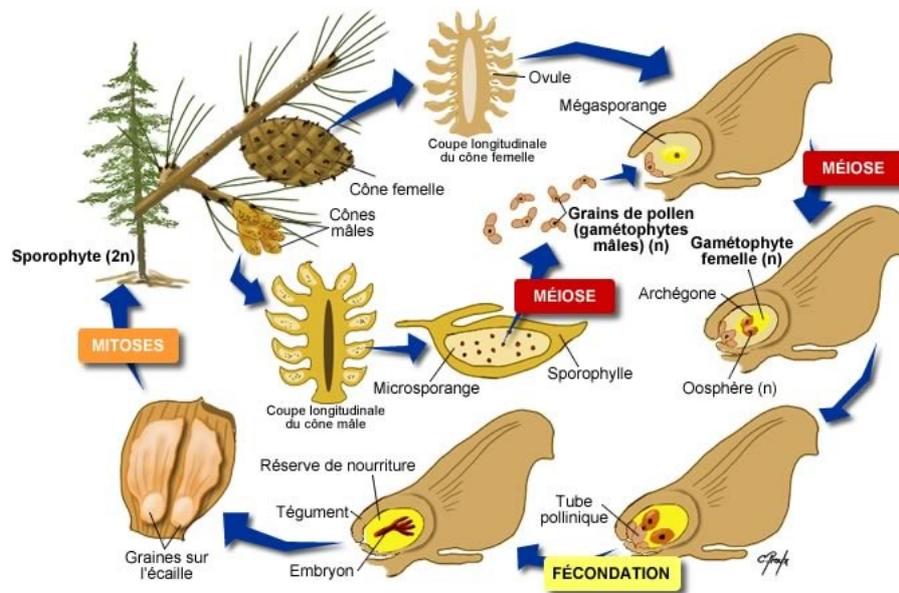


Figure 4. Cycle de développement chez le pin (gymnosperme).

1.1.2 Reproduction par apomixie

Dans le présent travail, on définira l'apomixie ou agamospermie comme le mode de reproduction pour lequel l'embryon est formé sans fécondation, à partir des cellules non réduites en raison d'une méiose modifiée ou absente.

1.1.2.1 Apomixie classique ou « maternelle »

L'apomixie femelle implique la production d'embryons d'origine génétique maternelle (Asker et Jerling 1992, Koltunow 1993). Ce type d'apomixie se produit dans environ 35 familles d'angiospermes (Hanna et Barshaw 1987), notamment chez les Asteraceae, Rosaceae, Poaceae, Orchidaceae et Liliaceae, dans lesquelles des espèces ornementales peuvent être trouvées (Carneiro *et al.* 2006). Selon l'origine des cellules non réduites, ce mode de reproduction peut être soit du type sporophytique ou du type gamétophytique. La différence entre les deux types principaux d'apomixie femelle est donc fondée sur l'origine et le type de développement ultérieure de la cellule qui donne naissance à l'embryon.

Dans l'apomixie femelle sporophytique, aussi appelée embryonie adventive, la formation de l'embryon (développé à partir d'une cellule du nucelle ou d'une autre cellule somatique de l'ovaire) ne passe pas par la formation d'un gamétophyte (Koltunow *et al.* 1995, Meeûs *et al.* 2007). Le développement de l'embryon est initié par la division mitotique du noyau cellulaire (Barshaw 1980), tandis que le développement méiotique du sac embryonnaire est maintenu (Lakshmanan et Ambegaokar 1984). Ce type de multiplication se

présente généralement dans les espèces de *Citrus* mais rarement chez les autres plantes supérieures.

L'apomixie femelle gamétophytique est la plus fréquente. Elle se caractérise par le développement de l'embryon à partir du sac embryonnaire (gamétophyte) non réduit (Asker et Jerling 1992, Nogler 1984a et 1994, Meeûs *et al.* 2007), conservant par conséquent le jeu de chromosomes maternels. L'aposporie et la diplosporie sont les différents types d'apomixie femelle gamétophytique (Figure 5). Pour la diplosporie, le sac embryonnaire non réduit est dérivé d'une cellule générative qui est la cellule mère de la mégaspore (Maraschin *et al.* 2005). Dans le cas de l'aposporie, le sac embryonnaire ou gamétophyte est formé à partir d'une cellule somatique (Nogler 1984b, Meeûs *et al.* 2007).

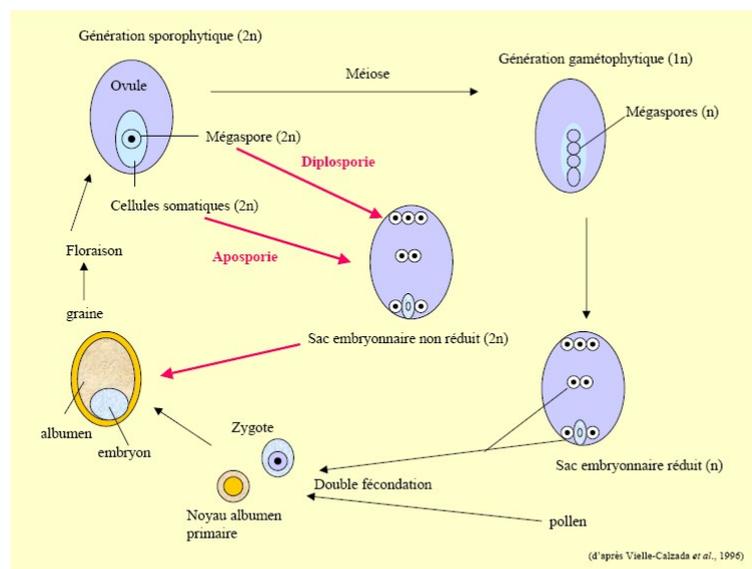


Figure 5. Apomixie gamétophytique.

1.1.2.2 Apomixie paternelle

La reproduction par apomixie paternelle est le développement apomictique de l'embryon à partir du gamétophyte mâle non réduit, à l'intérieur du gamétophyte femelle. Ce type d'apomixie a été mis en évidence dans l'espèce *Cupressus dupreziana*. Chez ce gymnosperme, l'embryon se développe à partir du pollen diploïde. Il s'agit donc d'une diplosporie mâle. Le gamétophyte femelle n'apporte que les substances nutritives. Le cyprès du Tassili serait donc aujourd'hui la seule espèce connue chez les végétaux à présenter un tel système de reproduction (Pichot *et al.* 2001).

Si la production de descendants ne portant que les chromosomes maternels, issus des processus comme l'apomixie ou la parthénogenèse (nommé en général gynogenèse) est un

phénomène assez fréquent, la production d'une « descendance paternelle » au contraire a rarement été rapportée (Mackone et Halpern 2003). Chez les animaux, cela arrive naturellement chez certains mollusques d'eau douce (genre *Corbicula*) (Komaru *et al.* 1998) et chez les hybrides interspécifiques de phasmes *Bacillus rossius* et *Bacillus grandii* (Tinti et Scali 1995). Elle a aussi été observée chez des mutants de *Drosophila melanogaster* (Komma et Endow 1995) ou après l'irradiation d'œufs de poisson (Araki *et al.* 1995).

1.1.2.3 Avantages et inconvénients de l'apomixie

La reproduction asexuée présente des désavantages comme l'accumulation de mutations délétères due à l'absence de recombinaison (Müller 1964). Au contraire, la reproduction sexuée permet le brassage constant de gènes entre les individus d'une population, ce qui permet de purger le génome des mutations délétères (Kondrashov 1982). Les possibilités d'adaptation à un milieu changeant constituent un avantage évolutif pour les individus à reproduction sexuée (Van Dijk et van Damme 2000). Contrairement à l'autofécondation ou à la reproduction entre individus consanguins, la reproduction asexuée n'expose pas les mutations délétères récessives à la sélection. En population réduite, la reproduction asexuée pourrait mieux préserver l'hétérozygotie que le croisement, au moins à court terme (Petit et Hamper 2006).

La reproduction par apomixie offre un certain avantage adaptatif. En effet, chez les lignées apomictiques, des individus hétérozygotes (sauf cas de la diplosporie avec une restitution lors de la deuxième division méiotique, « Second Division Restitution » en anglais, pour laquelle les noyaux non réduits sont homozygotes) peuvent se reproduire et se répandre largement dans la population en raison de leur aptitude à la formation des graines sans brassage génétique (Gustafsson et Mergen 1964). Cette absence de recombinaison entraîne une variabilité génétique réduite qui représente un inconvénient à long terme en comparaison à la reproduction sexuée, et qui pourrait avoir une répercussion sur la capacité d'adaptation de la lignée apomictique à l'évolution du milieu (Van Dijk et van Damme 2000). Du point de vue de l'amélioration des plantes et de la création de nouvelles variétés, ce mode de reproduction offre aussi un avantage car il donne la possibilité de fixer et propager un génotype souhaité, raison pour laquelle l'ingénierie génétique lui a porté beaucoup d'intérêt. Néanmoins, jusqu'à présent il n'a pas été possible de manipuler génétiquement le caractère apomictique pour la reproduction clonale à partir de graines (Bicknell et Koltunow 2004).

Les gymnospermes présentant une reproduction asexuée sont plutôt rares parmi les arbres forestiers ayant un intérêt économique, bien qu'on rencontre l'apomixie « femelle » chez *Alnus*, *Euonymus*, *Sorbus* et d'autres genres, et que de nombreuses espèces, comme les trembles, les peupliers et les saules se reproduisent végétativement (Gustafsson et Mergen

1964). L'apomixie paternelle observée chez le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus) constitue une situation particulière pour laquelle le pollen non réduit a besoin d'une « mère porteuse » pour pouvoir se développer en embryon. De ce fait, l'avantage adaptatif (fitness doublée) de l'apomixie classique (hors pseudogamie) due à la nécessité d'un seul parent (« la mère ») disparaît avec l'apomixie mâle. Ce point sera rediscuté au chapitre 3.

1.2 Les Cupressacées

La classification des Cupressacées est la suivante :

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Coniferophyta*

Classe : *Pinopsida*

Ordre : *Pinales*

Famille : *Cupressaceae*

D'après Farjon (2005), au sein des Cupressacées, 133 espèces sont reconnues dans 30 genres. Cette famille comprend désormais les espèces de l'ancienne famille des Taxodiaceae, mais exclut l'énigmatique conifère *Sciadopitys verticillata* du Japon, qui est maintenant généralement traité séparément dans le monotype de la famille des Sciadopityaceae (Brunsfield *et al.* 1994, Farjon 1998).

Sur la base de critères génétiques et morphologiques (Gadek *et al.* 2000, Farjon 2005), il est actuellement proposé de diviser la famille Cupressaceae en sept sous-familles :

- **Cunninghamioideae** (Zucc. ex Endl.) Quinn (*Cunninghamia*)
- **Taiwanoideae** L.C.Li (*Taiwania*)
- **Athrotaxidoideae** L.C.Li (*Athrotaxis*)
- **Sequoioideae** Saxton (*Sequoia*, *Sequoiadendron*, *Metasequoia*)
- **Taxodioideae** Endl. ex K.Koch (*Taxodium*, *Glyptostrobus*, *Cryptomeria*)
- **Callitroideae** Saxton (*Callitris*, *Actinostrobus*, *Neocallitropsis*, *Widdringtonia*, *Diselma*, *Fitzroya*, *Austrocedrus*, *Libocedrus*, *Pilgerodendron*, *Papuacedrus*)

- **Cupressoideae** Rich. ex Sweet (*Thuja*, *Thujopsis*, *Chamaecyparis*, *Fokienia*, *Calocedrus*, *Tetraclinis*, *Microbiota*, *Platycladus*, *Callitropsis*, *Cupressus*, *Juniperus*)

1.2.1 Le genre *Cupressus*

1.2.1.1 Classification générale

Les conifères qui ont le nom commun de « cyprès » appartiennent au genre *Cupressus* qui est l'un des genres de la famille Cupressaceae. En général, les espèces appartenant à ce genre montrent une plasticité aux conditions édaphiques et certaines ont une remarquable tolérance à la sécheresse. Les cyprès peuvent être trouvés sous climats tempérés chauds, dans l'hémisphère Nord, plus précisément autour de la Méditerranée, en Asie et en Amérique du Nord (Gellini et Grossoni 1979, Allemand 1979, Ducrey *et al.* 1999).

Cyprès méditerranéens (Figure 6) : *Cupressus sempervirens* L. (1753), *Cupressus atlantica* Gaussen (1950), *Cupressus dupreziana* A. Camus (1926).

Cyprès asiatiques (Figure 7) :

Groupe chinois : *Cupressus duclouxiana* Hickel (1914), *Cupressus funebris* Hendlicher (1947), *Cupressus chenghiana* S. Y. Hu (1964).

Groupe himalayen : *Cupressus cashmeriana* Royle (1867), *Cupressus torulosa* D. Don (1825), *Cupressus gigantea* Cheng et Fu (1975).

Cyprès américains (Figure 8) :

Groupe arizonica : *Cupressus arizonica* Greene (1882), *Cupressus glabra* Sudworth (1910), *Cupressus montana* Wiggins (1933), *Cupressus nevadensis* Abrams (1919), *Cupressus stephensonii* C. B. Wolf (1948).

Groupe goveniana : *Cupressus goveniana* Gordon (1849), *Cupressus abramsiana* C. B. Wolf (1948), *Cupressus pygmaea* (Lemm.) Sargent (1901).

Groupe guadalupensis : *Cupressus guadalupensis* S. Watson (1879), *Cupressus forbessi* Jepson (1922).

Autres : *Cupressus bakeri* Jepson (1909), *Cupressus lusitanica* Miller (1768), *Cupressus macnabiana* Murray (1855), *Cupressus macrocarpa* Hartweg (1847), *Cupressus sargentii* Jepson (1909).

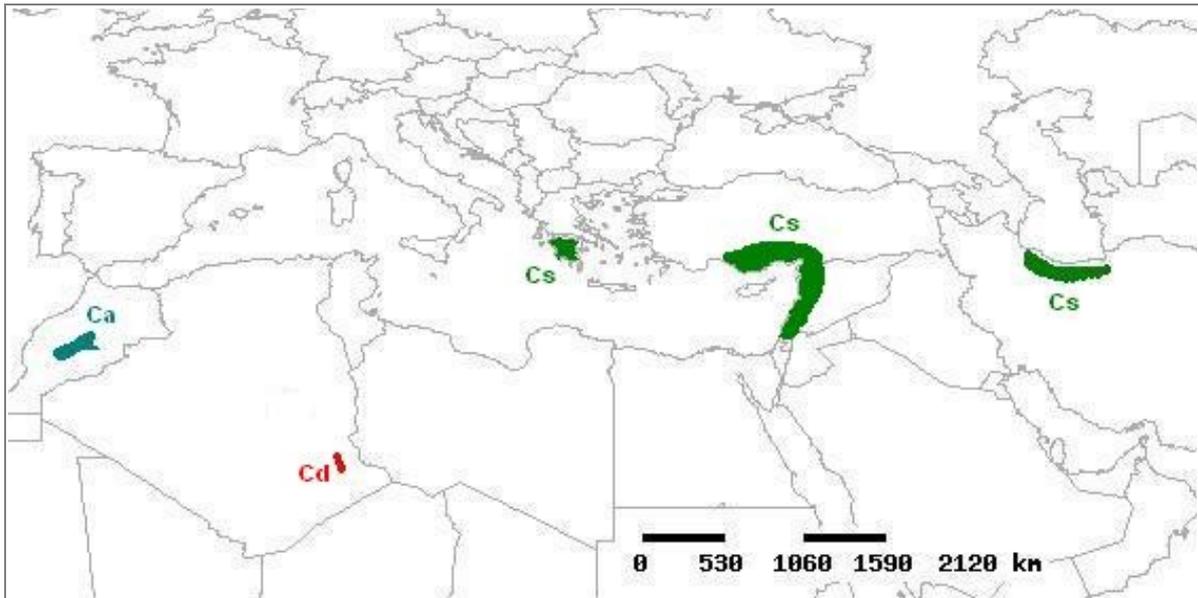


Figure 6. Répartition des populations naturelles des cyprès *Cupressus sempervirens* (Cs), *Cupressus atlantica* (Ca) et *Cupressus dupreziana* (Cd) (d'après Stewart 1969, Ducrey *et al.* 1999).

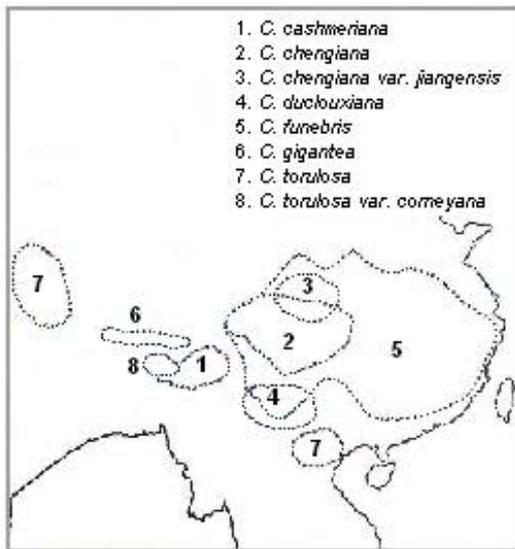


Figure 7. Répartition des populations naturelles des cyprès asiatiques (d'après Silba 1981, Farjon 1998).



Figure 8. Répartition des populations naturelles des cyprès américains (d'après Ducrey *et al.* 1999).

1.2.1.2 Taxonomie proposée des cyprès

Little (2006) a proposé, sur la base de résultats des travaux de phylogénie (Little *et al.* 2004), la division des espèces du genre *Cupressus* en deux groupes : les espèces du Nouveau Monde et les espèces de l'Ancien Monde.

Les espèces du premier groupe (Nouveau Monde) (Tableau 1), seraient plus proches du genre *Juniperus* que les espèces du deuxième groupe (Ancien Monde). Elles ont été assignées (avec deux espèces de *Xanthocyparis*) au nouveau genre *Callitropsis* Oersted. Les espèces de l'Ancien Monde (Tableau 2) restent dans le genre *Cupressus* L.

Tableau 1. Cyprès proposés pour être transférés au genre *Callitropsis*.

Espèce	Variétés (considérées pour certains botanistes comme des espèces distinctes)	Nom commun	Change de nomenclature selon Little (2006)
<i>Cupressus abramsiana</i> C. B. Wolf	<i>Cupressus goveniana</i> var. <i>abramsiana</i>	Cyprès de Santa Cruz	<i>Callitropsis abramsiana</i>
<i>Cupressus arizonica</i> Greene	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>arizonica</i>	Cyprès de l'Arizona	<i>Callitropsis arizonica</i>
<i>Cupressus bakeri</i> Jepson		Cyprès de Baker ou cyprès de Modoc	<i>Callitropsis bakeri</i>
<i>Cupressus benthamii</i> Endl.	<i>Cupressus lusitanica</i> var. <i>benthamii</i>	Cyprès de Bentham	<i>Callitropsis benthamii</i>
<i>Cupressus forbesii</i> Jepson	<i>Cupressus</i> <i>guadalupensis</i> var. <i>forbesii</i>	Cyprès de Forbes ou cyprès de Tecate	<i>Callitropsis forbesii</i>
<i>Cupressus glabra</i> Sudworth	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>glabra</i>	Cyprès blanc de l'Arizona	<i>Callitropsis glabra</i>
<i>Cupressus goveniana</i> Gordon	<i>Cupressus goveniana</i> var. <i>goveniana</i>	Cyprès de Gowen	<i>Callitropsis goveniana</i>
<i>Cupressus</i> <i>guadalupensis</i> S. Watson	<i>Cupressus</i> <i>guadalupensis</i> var. <i>guadalupensis</i>	Cyprès de Guadelupe	<i>Callitropsis</i> <i>guadalupensis</i>
<i>Cupressus lusitanica</i> Miller	<i>Cupressus lusitanica</i> var. <i>lusitanica</i>	Cyprès du Portugal ou cyprès du Mexique	<i>Callitropsis lusitanica</i>
<i>Cupressus macnabiana</i> A. Murray		Cyprès de MacNab	<i>Callitropsis</i> <i>macnabiana</i>
<i>Cupressus macrocarpa</i> Hartweg ex Gordon		Cyprès de Lambert ou cyprès de Monterrey	<i>Callitropsis</i> <i>macrocarpa</i>
<i>Cupressus montana</i> Wiggens	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>montana</i>	Cyprès San Pedro Martir	<i>Callitropsis montana</i>
<i>Cupressus nevadensis</i> Abrams	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>nevadensis</i>	Cyprès Piute	<i>Callitropsis nevadensis</i>
<i>Xanthocyparis</i> <i>nootkatensis</i> D. Don		Cyprès de Nootka	<i>Callitropsis nootkaensis</i>
<i>Cupressus pygmaea</i> (Lemmon) Sargent	<i>Cupressus goveniana</i> var. <i>pygmaea</i>	Cyprès de Mendocino	<i>Callitropsis pygmaea</i>
<i>Cupressus sargentii</i> Jepson		Cyprès de Sargent	<i>Callitropsis sargentii</i>
<i>Cupressus stephensonii</i> C. B. Wolf	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>stephensonii</i>	Cyprès Cuyamaca	<i>Callitropsis</i> <i>stephensonii</i>
<i>Xanthocyparis</i> <i>vietnamensis</i> Farjon et Hiep		Cyprès doré vietnamien	<i>Callitropsis</i> <i>vietnamensis</i>

Tableau 2. Cyprès du genre *Cupressus*.

Espèce	Nom commun
<i>Cupressus atlantica</i> Gaussen	Cyprès de l'Atlas ou cyprès du Maroc
<i>Cupressus cashmeriana</i> Royle ex Carrière	Cyprès de Cachemire ou cyprès de Bhutan
<i>Cupressus chengiana</i> S. Y. Hu	Cyprès de Cheng
<i>Cupressus duclouxiana</i> Hickel in Camus	Cyprès de Yunnan
<i>Cupressus dupreziana</i> A. Camus	Cyprès du Tassili ou cyprès de Duprez
<i>Cupressus funebris</i> Endlicher	Cyprès funèbre ou cyprès de Chine
<i>Cupressus gigantea</i> Cheng et Fu	Cyprès de Tibet
<i>Cupressus sempervirens</i> Linnaeus	Cypès de Provence, cyprès commun, cyprès vert ou cyprès méditerranéen
<i>Cupressus torulosa</i> D. Don	Cyprès de l'Himalaya

1.2.2 Les cyprès méditerranéens

Les cyprès méditerranéens sont actuellement inclus dans le genre des Cupressacées de l'Ancien Monde (Little 2006). Dans ce groupe, 3 espèces (Figure 6) (Yani *et al.* 1990 ; Rushforth *et al.* 2003) ont été considérées. *Cupressus sempervirens* L. qui occupe une aire naturelle très dispersée (Grèce, Turquie, Syrie, Liban, Chypre, Iran), est aussi le plus répandu car il a été introduit en Grèce continentale, Italie, France, Espagne, Italie, Portugal, Yougoslavie (Ducrey *et al.* 1999). *Cupressus atlantica* Gaussen est originaire du Haut Atlas Occidental Marocain où il constitue des peuplements assez dégradés et parfois réduits à quelques arbres (Alifriqui 1993). *Cupressus dupreziana* A. Camus a son habitat naturel dans le désert du Tassili en Algérie où il est limité à 233 arbres (Abdoun et Beddiaf 2002). Cette espèce est considérée comme une relique. Certains auteurs considèrent l'espèce *C. dupreziana* comme une variété de *C. atlantica* du fait de leur proximité géographique ou leur ressemblance.

Chez les gymnospermes, l'embryon diploïde est généralement entouré d'un mégagamétophyte haploïde qui provient d'une seule des 4 spores produites par la méiose. L'analyse de la diversité génétique de conifères méditerranéens a mis en évidence des particularités reproductives chez les cyprès : a) La polyploïdie de l'endosperme avec des niveaux pairs (*C. dupreziana*) et avec des niveaux pairs-impairs (*C. sempervirens* et *C. atlantica*, Pichot et El Maâtaoui 1997), due à un phénomène original qui est la fusion de noyaux ; b) l'origine tétrasporique du mégagamétophyte (El Maâtaoui *et al.* 1998), contenant l'ensemble du génome maternel, chez *C. sempervirens*, en effet, les 4 spores persistent et contribuent à son développement ; c) la production de pollen viable diploïde chez *C. dupreziana* (Pichot et El Maâtaoui 2000).

1.2.3 L'espèce *Cupressus sempervirens* Linnaeus (1753)

1.2.3.1 Description et écologie

Cupressus sempervirens L. (Figure 9), cyprès vert ou cyprès de Provence, est originaire d'Iran, ainsi que de Syrie, Turquie, Chypre et plusieurs îles grecques (Crète, Samos, Rhodes, Kos, Symi et Melos). Cette espèce a été introduite dans la plupart des pays autour de la Méditerranée (Vidakovic 1991). Il est probable que cette espèce ait occupé pendant le Tertiaire de grandes surfaces (Axelrod 1958) qui ont été réduites au cours du temps par la forte pression humaine, les incendies, le pâturage, l'exploitation des forêts et, plus récemment, la maladie du chancre du cyprès (Kayacik *et al.* 1979, Sumer 1987, Graniti 1998).



Figure 9. *Cupressus sempervirens* L. en population naturelle en Turquie (Koprülü).

L'arbre peut avoir une taille de 20 à 30 m de haut, avec un tronc droit. L'écorce est grise brunâtre, fine et striée verticalement. Les rameaux écaillés sont bruns. Le feuillage est vert foncé, persistant et aromatique. De petites feuilles triangulaires, étroitement imbriquées sur quatre rangs recouvrent totalement les rameaux. Sur de courtes ramules se localisent des petites feuilles glanduleuses (glandes résinifères). Les cônes mâles se localisent à l'extrémité des rameaux. Les cônes femelles globuleux à elliptiques (2-3 cm de long) sont sur une tige courte. Ils sont brillants, d'une couleur gris brunâtre à maturité. Ils sont composés de 8 à 14 écailles ligneuses opposées, légèrement mucronées et polygonales. Chaque écaille fertile contient entre 8 à 20 graines brun foncé, aplaties et très légèrement ailées (Vidakovic 1991).

Le cyprès vert est apprécié pour la qualité de son bois et son huile essentielle extraite à partir des rameaux. Il est largement utilisé en plantations comme brise-vent ou comme arbre ornemental (Papageorgiou *et al.* 1993, 1994). Il est tolérant aux basses températures jusqu'à -20 °C (Tucovic 1956, Raddi et Panconesi 1989). Il résiste à la sécheresse et aux sols acides et alcalins. Son système racinaire est bien développé (Vidakovic 1991).

1.2.3.2 Remarques taxonomiques

De nombreux auteurs ont reconnu que l'espèce *Cupressus sempervirens* présente deux formes de houppier (Figure 10), fastigié (pyramidal) ou horizontal, et ont assigné des rangs taxonomiques sous-spécifiques sur cette base. Il est généralement estimé que seule la forme horizontale précède l'activité humaine, la forme fastigiée ayant une origine horticole datant des premiers temps historiques ou préhistoriques. Ainsi la forme fastigiée serait un groupe cultivé, et non une variété ou sous-espèce (Farjon 2005). Plus généralement toutes les formes intermédiaires entre ces deux extrêmes se rencontrent au sein du cyprès vert.



Figure 10. *Cupressus sempervirens* pyramidal (P) et horizontal (H).

1.2.4 L'espèce *Cupressus atlantica* Gaussen (1950)

Le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen) (Figure 11) est endémique des montagnes du Haut Atlas occidental de Maroc. Sur une superficie totale d'environ 200 km² se répartissent de petits groupes et un certain nombre d'arbres isolés. La majorité de ces ressources se situe dans la vallée de l'Oued n'Fiss au sud de Marrakech. La superficie occupée par cette espèce dans son aire naturelle a diminué (par exemple entre les années 1950 et 1986 elle est passée de 5500 ha à 1460 ha), à cause de la dégradation de l'habitat, du surpâturage et de l'exploitation. Les arbres poussent à une altitude située entre 1100 et 2000 m avec des précipitations annuelles de 350 à 700 mm (Alifriqui 1993, Pichot 1997). Les températures

sont, en moyenne, de 30 °C pour l'été à moins de 0 °C pour l'hiver (Stewart 1981, WCMC 1999). Actuellement, *C. atlantica* est considéré par l'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) comme une espèce en danger de disparition (WCMC 1999).

L'arbre peut atteindre une taille de 35 m. Sa forme est conique et le tronc est droit. L'écorce est grise brunâtre et striée longitudinalement. Les branches se courbent vers le haut. Les rameaux sont écailleux et le feuillage vert bleuâtre est légèrement glauque, surtout sur les jeunes arbres. Les feuilles présentent une glande résinifère (Stewart, 1981).



Figure 11. Population naturelle de *Cupressus atlantica* Gaussen au Maroc (Aghbar).

1.2.5 L'espèce *Cupressus dupreziana* A. Camus (1926)

Cette espèce est la plus importante pour le présent mémoire de thèse. En effet, il s'agit d'un cyprès très particulier, non seulement par son aire naturelle de distribution mais aussi pour ses caractéristiques reproductives. On présente ici les principales caractéristiques de l'espèce décrites à ce jour.

1.2.5.1 Description et écologie

Avant de la découverte du cyprès du Tassili par le capitaine Duprez en 1924, la présence d'un conifère au Sahara central était déjà soupçonnée. En effet, Duveyrier avait trouvé des objets touaregs fabriqués en bois résineux lors de son exploration de 1859 à 1861

dans le Tassili nord et le Fezzan. En 1906, Chudeau signale l'existence probable d'un thuya ou d'un cyprès dans le Hoggar et les montagnes du Tassili. D'autres voyageurs constatèrent par la suite que de vieilles portes et des poutres maîtresses des maisons des oasis de Rhat et de Djanet étaient construites avec le bois d'un conifère qui, d'après les dires des indigènes, existait encore dans les montagnes du sud du Tassili (Balachowsky 1955). En 1925, Lavauden (Lavauden 1926) a pu voir un arbre vivant dans l'oued Tamghit. Des échantillons qu'il préleva ont été remis au Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris. Ils ont été étudiés par Aimée Camus qui a décrit alors la nouvelle espèce : *Cupressus dupreziana* (Camus 1926) (Figure 12).

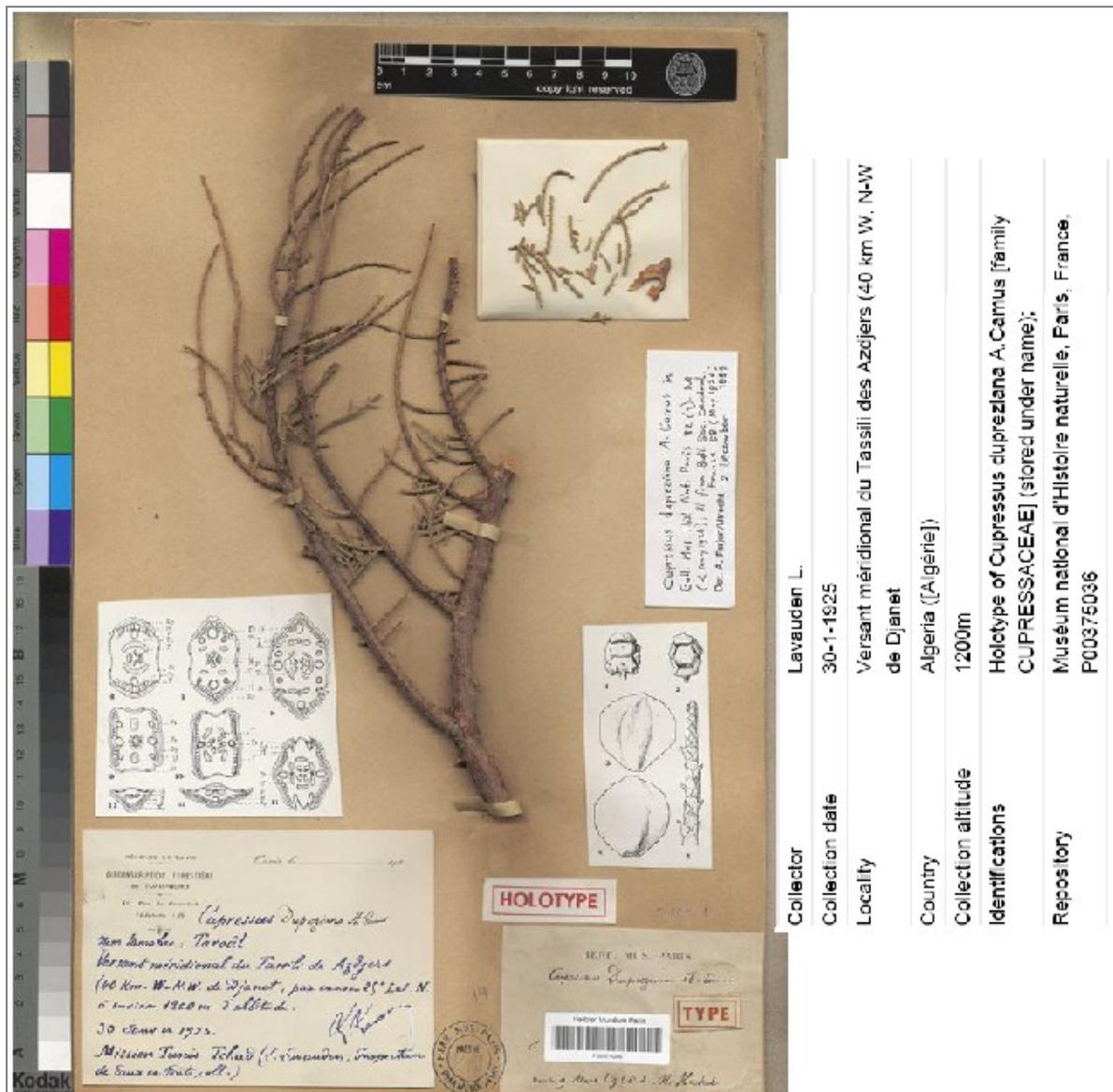


Figure 12. Holotype de *Cupressus dupreziana* A. Camus (d'après Aluka - bibliothèque numérique de ressources scientifiques venant et traitant de l'Afrique.

<http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.SPECIMEN.P00375036>).

Le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus) (Figure 13) est une endémique stricte du Tassili N'Ajjer, en Algérie au Sahara central, à 1500-2000 mètres d'altitude sous une pluviométrie n'excédant pas 30 mm par an. Il se trouve dans les ravins de montagne et dans les lits d'oueds. Il peut dépasser les 20 m de hauteur et atteindre plus de 10 m de diamètre. Tous les arbres adultes recensés sont trop mutilés pour qu'on puisse en voir la forme naturelle ; les jeunes, qui ont poussé dans un environnement protégé, présentent tout d'abord une forme buissonneuse ou compacte, mais articulée sur un axe central vertical (Stewart 1976).



Figure 13. Un cyprès *Cupressus dupreziana* A. Camus dans son aire naturelle.

D'après Stewart (1976), Ferrandes (1979) et Maire (1952), l'écorce de cette espèce est brune rougeâtre qui en vieillissant vire au grise-brune ; elle porte des fissures longitudinales mais ne présente pas de décortication. Les branches, qui forment avec le tronc un angle obtus, se recourbent vers le haut. La ramification des premières et secondes pousses tend à se faire sur deux plans et les premières sont considérablement aplaties. Le feuillage de ce cyprès est persistant et très dense, de couleur vert terne, légèrement pruinée, particulièrement sur l'arbre jeune. Les feuilles adultes sont des écailles cypressoïdes, opposés, décussées, imbriquées, légèrement aplaties, acuminées, et présentent une glande résinifère. Les cônes femelles sont portés à l'extrémité de ramules très courtes. Ils sont pourpres, ovoïdes ou ellipsoïdes de 12 à 24 x 10 à 17 mm. Ils deviennent gris-brunâtres à maturité, mats ou peu brillants, allongés (18 à 24 x 16 à 20 mm), portant entre 10 à 12 écailles ligneuses, à écusson plus large que haut, rugueux radialement et avec un mucron très court, arrondi. Les graines sont de couleur brun rougeâtre, ovales, aplaties de 4 x 5 mm à 5 x 6 mm et avec des ailes larges et fines. Les cônes mâles se localisent à l'extrémité des ramules. Ils sont de couleur jaunâtre à maturité, allongés

de 6 x 3 mm. Le grain de pollen est d'un diamètre de 38 microns. Il est le plus gros de toutes les espèces de cyprès.

Cupressus dupreziana est l'une des espèces ligneuses les plus résistantes à la sécheresse, et présente une bonne tolérance aux gelées (-10°C). Son bois, de densité moyenne, stable et balsamique, se prête aux utilisations les plus exigeantes. En plantation (peuplement artificiel), les fûts sont droits et les branches fines. La croissance est, semble-t-il, un peu plus lente que celle de *Cupressus sempervirens* dans les mêmes conditions. Elle pourrait être une espèce précieuse pour les plantations en régions arides. Les vieux arbres, ainsi que les souches et les troncs morts présentent un grand intérêt pour la dendrochronologie, du fait de la longévité de l'arbre et de la durabilité de son bois (Stewart 1976).

1.2.5.2 Biologie de la reproduction

L'étude des graines du cyprès du Tassili, récoltées dans l'aire naturelle algérienne ou en plantation conservatoire en France, met en évidence une très faible proportion de graines pleines, généralement moins de 10 % (Pichot *et al.* 2000). Ceci suggère un dysfonctionnement du système reproducteur de l'espèce pouvant contribuer à la faible régénération naturelle observée *in-situ*. La réalisation de travaux portant sur les caractéristiques des graines ont permis de montrer que les noyaux de l'endosperme de *C. dupreziana* présentaient une importante variabilité de leur quantité d'ADN correspondant à plusieurs niveaux de ploïdie (Pichot *et al.* 1998). Contrairement aux deux autres cyprès méditerranéens (*C. sempervirens* et *C. atlantica*) chez lesquels des niveaux pairs et impairs (1C, 2C, 3C, 4C, 5C...) avaient déjà été mis en évidence dans ce tissu (Pichot et El Maâtaoui, 1997), seuls des niveaux pairs (2C, 4C, 6C...) sont observés chez *C. dupreziana*. D'autre part Pichot et El Maâtaoui (2000) ont montré que chez le cyprès du Tassili des méioses mâles atypiques conduisent à la production de pollen diploïde, ce qui explique que les grains de pollen soient de plus grande taille que ceux des autres espèces de cyprès. Ces observations et l'absence de caractères d'origine maternelle chez des descendants de « mères » *C. dupreziana* ont conduit à émettre l'hypothèse d'une reproduction par apomixie paternelle (Pichot *et al.* 2001).

1.2.5.3 Distribution des cyprès dans l'aire naturelle et en collection

Les travaux réalisés par Abdoun et Beddiaf (2002) montrent que les arbres de l'espèce *Cupressus dupreziana* sont distribués sur une bande de 12 km de long par 6 kilomètres (en moyenne) de large, le long de la frontière sud-ouest du plateau du Tassili (Algérie), entre une altitude de 1430 et 1830 m (Figure 14). La répartition de ces cyprès est hétérogène selon le substrat. La plupart (68 %) se situe dans les fonds de vallées où il y a une importante profondeur de sable : 37 % se localisent dans les lits d'oueds sableux et 31 % sur des rocailles

sableuses. 22 % se localisent dans les fissures des dalles gréseuses, 8 % se localisent dans les crêtes et 2 % se localisent dans les Gueltas (résurgences d'eau, naturelles) sableuses ou rocailleuses.

Actuellement l'espèce est classée par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) comme espèce gravement menacée d'extinction (Conifer Specialist Group 2000). En effet, 233 cyprès vivants ont été dénombrés par Abdoun et Beddiaf (2002) dont la plupart présentent des ports variables allant de la forme fastigiée à la forme la plus tourmentée. Les plus âgés ont été estimés à plus de 2000 ans et occupent des sites difficiles d'accès. Leur hauteur varie dans l'aire naturelle de 3 m à 22 m et leur circonférence de 0.32 m à 12 m. Le plus vieux a 22 m de haut pour une circonférence de 12 m (Abdoun *et al.* 2005).

Le fort recul de l'espèce semble dû à la conjonction d'une intense exploitation humaine et d'une évolution défavorable du climat. La régénération dans l'habitat naturel est très limitée, notamment en raison de la diminution de la nappe phréatique (Abdoun et Beddiaf 2002).

Des plantations conservatoires ont déjà été installées en Algérie et en France. D'autres collections sont dispersées dans différents pays, mais malheureusement l'origine exacte du matériel végétal qui y est conservé n'est pas toujours connue et ces plantations ne représentent vraisemblablement qu'une petite partie des individus encore présents dans l'aire naturelle. L'évaluation des ressources génétiques sera développée au chapitre 3.

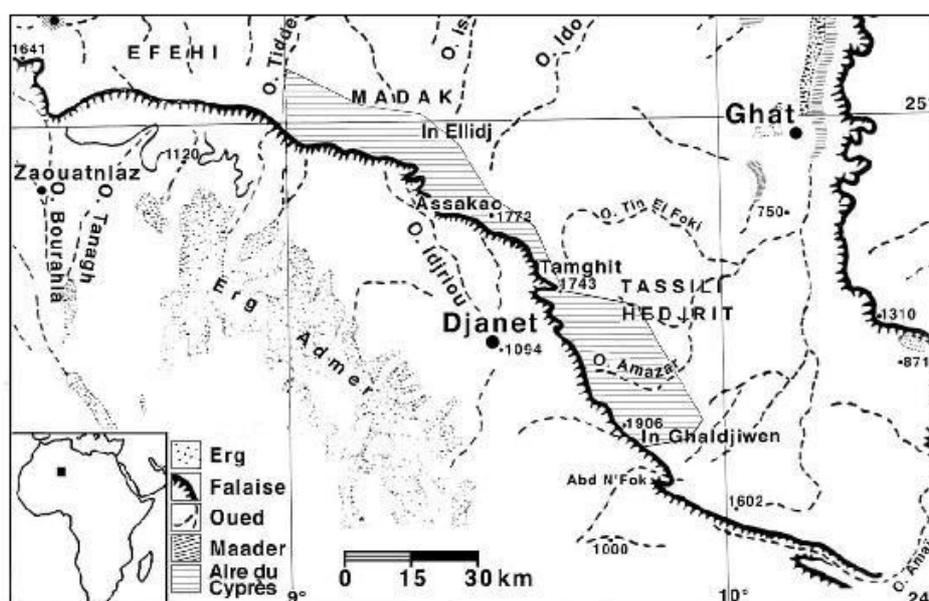


Figure 14. Aire de répartition de *Cupressus dupreziana* au Tassili n'Ajjer (en hachuré) près de Djanet en Algérie (d'après Abdoun et Beddiaf 2002).

CHAPITRE 2. CARACTÉRISATION DES CYPRÈS ISSUS DE « MÈRES » *Cupressus dupreziana* A. CAMUS

Ce chapitre, divisé en cinq parties, concerne la caractérisation des cyprès issus de mères *C. dupreziana* présentes dans l'aire naturelle ou en collection dans le sud-est de la France. La première partie est dédiée à la description du matériel végétal en termes d'origine et d'effectif. La seconde partie est dédiée à la détermination du niveau de ploïdie et au phénotype des descendants. La troisième concerne l'évaluation de l'homozygotie ou hétérozygotie des cyprès *C. sempervirens* diploïdes avec des marqueurs moléculaires. La quatrième décrit la croissance et la phyllotaxie des cyprès *C. sempervirens* haploïdes et diploïdes. Enfin, la dernière partie aborde le développement des cônes mâles et la microsporogénèse chez deux cyprès *C. sempervirens*, l'un haploïde et l'autre homozygote.

2.1 Matériel végétal

2.1.1 Arbres mères et récoltes de graines

Des graines récoltées *in-situ* (1993-1994), sur le plateau du Tassili N'Ajjer en Algérie, sur 16 « arbres mères » ont été conservées en chambre froide à 4°C à l'INRA d'Avignon. Des récoltes *ex-situ* de graines issues de la pollinisation libre de *C. dupreziana* ont aussi été faites entre 1999 et 2004 à partir de collections privées (Avignon = 1 arbre mère, Carpentras = 4 arbres mères), des collections de l'INRA (arboretum de l'Estérel = 87 arbres mères, arboretum de Ruscas = 6 arbres mères) ou de la collection du Jardin Botanique de Montpellier (7 arbres mères). Ces collections sont localisées dans le sud-est de la France et ont été réalisées à partir de matériel d'origine plus ou moins contrôlée, sous forme de graines ou greffes. Le semis des graines a été effectué en 2000, 2001 et 2005. Des graines issues de pollinisations contrôlées, entre *C. dupreziana* (collection de l'INRA) comme arbre mère et le pollen de *C. sempervirens* (17 pollinisations), le pollen de *C. arizonica* (2 pollinisations) et le pollen de *C. funebris* (2 pollinisations) ; ainsi que des graines issues de l'autopollinisation de *C. dupreziana* (collection de l'INRA), ont été incluses pour le semis réalisé l'année 2005. Enfin, on a inclus comme témoins des graines récoltées sur des cyprès *C. atlantica* (récolte *in-situ* en 1998) et/ou des *C. sempervirens* issus des collections de l'INRA (récoltes en 1995 et 1997).

2.1.2 Semis des années 2000 et 2001

Différents lots de graines ont été mis à germer en boîtes de Pétri à l'INRA d'Avignon. Les graines germées ont été plantées en conteneurs de 400 cm³ et cultivées en serre dans le

domaine de Ruscas à Bormes Les Mimosas - INRA. Le semis de l'année 2000 a produit 312 plantules, tandis que le semis de l'année 2001 a produit 294 plantules. Des notations, pour les deux séries, ont été faites sur le nombre d'arbres mères ayant produit des plantules, la descendance obtenue par collection de cyprès, ainsi que les premières plantules mortes après l'établissement des semis (Tableau 3).

Tableau 3. Variabilité de la germination et de la proportion des plantules des semis 2000 et 2001.

Origine	<i>Cupressus dupreziana</i> en collections <i>ex-situ</i>								<i>Cupressus dupreziana in-situ</i> Algérie	<i>Cupressus atlantica in-situ</i> Maroc	<i>Cupressus sempervirens</i> (collections INRA)			
	Carpentras		Estérel		Montpellier		Ruscas							
Année	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001		
Nombre d'arbres mères*	1 (1)	4 (4)	28 (18)	82 (13)	7 (5)	6 (6)	5 (2)	5 (1)	12 (6)	-	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (2)
% de germination	0.38	1.83 à 4.25	0.22 à 1.14	0.42 à 3.85	0.47 à 1.94	1.09 à 2.5	0.9 à 1.79	2.93	0.62 à 2.94	-	7.13	7.8	25.4	7.5 à 24.8
Plantules**	18 (-1)	73 (-9)	92 (-8)	21 (-5)	43 (-2)	89 (-8)	18	22 (-2)	38	-	56	66	47	23

* Effectif total et effectif ayant produit des plantules entre parenthèses.

** Effectif de plantules et mortalité précoce des cyprès entre parenthèses.

2.1.3 Bouturage et greffage

Des greffages et bouturages de quelques cyprès issus des semis des années 2000 et 2001 ont été réalisés entre les années 2003 et 2005 (Tableau 4). Les porte-greffes étaient des cyprès *Cupressus sempervirens*. On a inclus comme témoins de bouturage des plantules issues de graines de *C. dupreziana (in-situ)*, *C. sempervirens* et *C. atlantica*, obtenues lors du semis de l'année 2000.

Tableau 4. Nombre de boutures et greffes réalisées entre les années 2003 et 2005.

Origine	Cyprès issus de graines de								<i>Cupressus dupreziana in-situ</i> Algérie	<i>Cupressus atlantica in-situ</i> Maroc	<i>Cupressus sempervirens</i> (collections INRA)
	<i>Cupressus dupreziana</i> en collections <i>ex-situ</i>										
	Carpentras		Estérel		Montpellier		Ruscas				
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2000	2000
AS											
CM	2	9	15	2	5	2	3		1	1	2
Boutures	5	9	54	3	30	3	4		6	7	18
Greffes	3	6	21	1	5	2	3		-	-	-

AS = Année du semis. CM = Cyprès multipliés.

2.1.4 Semis de l'année 2005

Des graines de cyprès issues de 4 origines : *Cupressus dupreziana* d'Algérie (témoin), *Cupressus dupreziana* en collection en France (pollinisation libre), *Cupressus dupreziana* en collection (Figure 15) de l'INRA (autopollinisation et avec différentes modalités de pollinisation avec du pollen de *C. sempervirens*, *C. arizonica* ou *C. funebris*), *Cupressus sempervirens* issus des collections de l'INRA (témoin – pollinisation libre), ont été mis en germination (mai – juin 2005) en boîtes de Pétri. 1019 graines germées (Figure 16a) ont été repiquées (entre le 30 mai et le 6 juillet 2005) en mini mottes (Figure 16b). Les plantules ont ensuite été transférées à la pépinière des Milles (Aix en Provence) afin d'être repiquées en conteneurs WM de 600 cm³ (Figure 16c). 563 plantules ont effectivement été repiquées (17 caisses de 32 plants et 1 caisse avec 19 plants) (Tableau 5).

Tableau 5. Variabilité de la germination et de la proportion des plantules repiquées du semis 2005.

Origine	<i>Cupressus dupreziana</i> en collections <i>ex-situ</i>			<i>Cupressus dupreziana</i> (collection de l'INRA) <i>ex-situ</i> Autopollinisation	<i>Cupressus dupreziana in-situ</i> Algérie	<i>Cupressus sempervirens</i> (collections INRA)	<i>Cupressus dupreziana</i> (collection de l'INRA) avec différentes modalités de pollinisation avec le pollen de		
	Avignon	Montpellier	Ruscas				+ <i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Cupressus arizonica</i> ++	<i>Cupressus funebris</i> ++
Nombre d'arbres mères*	1 (1)	2x2 (2x2)	1x2 (1x2)	1x3 (1x2)	4 (4)	11 (11)	1x24 (1x17)	1x2 (1x2)	1x5 (1x2)
% de germination	3.23	0.3 à 7.37	1.2 à 2.47	1.83 à 3.33	1.65 à 5.8	1.58 à 27.45	0.34 à 4.64	1.58 à 1.62	0.99
Repiquage en mini mottes	97	252	35	12	221	275	89	21	17
Repiquage en WM de 600 cm ³ **	51 (-2)	137 (-6)	19 (-1)	7	108	172	47 (-4)	14	8

* Effectif total et effectif ayant produit des plantules entre parenthèses.

** Sélection de plantules repiquées : avec le phénotype de *C. sempervirens* (haploïdes et diploïdes homozygotes) ou sélection d'un sous échantillon pour les témoins. Mortalité précoce des cyprès entre parenthèses.

+ La plupart des pollinisations contrôlées, en utilisant des sacs de polyester, ont été faites avec 100% de pollen de *C. sempervirens*, et certains ont été faites avec du pollen mélangé : environ $\frac{3}{4}$ de pollen de *C. sempervirens* et $\frac{1}{4}$ de pollen de *C. dupreziana*. ++ Surpollinisation. Pour les détails voir le Tableau 8.



Figure 15. Cyprès *Cupressus dupreziana* en collection de l'INRA (Ruscas) utilisé pour l'autopollinisation et les pollinisations contrôlées. La plupart des pollinisations contrôlées, en utilisant des sacs de polyester, ont été faites avec 100% de pollen de *C. sempervirens*, et certains ont été faites avec du pollen mélangé : environ $\frac{3}{4}$ de pollen de *C. sempervirens* et $\frac{1}{4}$ de pollen de *C. dupreziana*. D'autres pollinisations contrôlées ont été faites avec le pollen de *C. arizonica* ou *C. funebris* (dans les deux cas il s'agissait d'une surpollinisation). Les graines récoltées ont fait partie du semis de l'année 2005.



Figure 16. Graines de cyprès germées (a) en boîtes de Pétri, leur repiquage en mini mottes (b) et repiquage de plantules en conteneurs WM de 600 cm³ (c).

2.1.5 Caractéristiques analysées et tests réalisés à partir du matériel végétal produit

Le matériel végétal produit a permis de réaliser les analyses et tests envisagés pour la thèse afin de caractériser les cyprès issus des « mères » *Cupressus dupreziana* A. Camus. Le Tableau 6 récapitule les caractéristiques analysées par année de semis ou de boutures et greffes. Les résultats de toutes les analyses sont présentés soit dans les parties suivantes de ce chapitre, soit dans le chapitre 3 dans lequel on a inclus un inventaire de l'espèce *C. dupreziana*.

Tableau 6. Récapitulatif des caractéristiques analysées à partir de cyprès produits.

	Semis 2000	Semis 2001	Boutures	Greffes	Semis 2005	Présenté dans la thèse
Niveau de ploïdie	x	x			x	Chapitre 2 (2.2)
Phénotype (<i>C. dupreziana</i> ou <i>C. sempervirens</i>)	x	x			x	Chapitre 2 (2.2)
Stabilité du niveau de ploïdie (cyprès <i>C. sempervirens</i> haploïdes)	x	x	x	x	x	Chapitre 2 (2.2)
Doublement provoqué du niveau de ploïdie (cyprès <i>C. sempervirens</i> haploïdes)			x	x		Chapitre 2 (2.2)
Homozygotie (cyprès avec le phénotype <i>C. sempervirens</i>)	x	x			x	Chapitre 2 (2.3)
Croissance et phyllotaxie (cyprès <i>C. sempervirens</i> haploïdes et homozygotes)					x	Chapitre 2 (2.4)
Production de cônes mâles et leur viabilité (cyprès <i>C. sempervirens</i>)	x					Chapitre 2 (2.5)
Diversité (pour les cyprès <i>C. dupreziana</i>)	x					Chapitre 3 (3.2)

2.2 Phénotypes et niveaux de ploïdie des plantules

2.2.1 Méthodologie

Afin de définir le phénotype des cyprès issus de « mères » *C. dupreziana*, plusieurs caractères morphologiques juvéniles ont été analysés. Le nombre de cotylédons, la longueur, la forme et la disposition de feuilles, ainsi que la couleur de feuillage, ont été suivis sur des plantules de quatre mois obtenues à partir des semis des années 2000 et 2001. Pour les plantules obtenues du semis de l'année 2005, le nombre et la longueur des cotylédons ont été mesurées sur des plantules de deux mois ; les autres caractères morphologiques ont été observés quand les plantules ont eu quatre mois. Le type morphologique de tous les cyprès a été noté en considérant aussi les anomalies phénotypiques observées.

Le niveau de ploïdie de chaque cyprès a été estimé par cytométrie en flux. Le DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) a été utilisé comme fluorochrome de l'ADN. La technique de cytométrie de flux permet la mesure qualitative et quantitative des caractéristiques physiques et chimiques de noyaux, cellules et de particules. On peut aussi compter les noyaux, les identifier et déterminer leur quantité d'ADN et déduire les niveaux de ploïdie. Au cours de l'analyse dans le cytomètre (Figure 17a), les noyaux marqués avec le fluorochrome sont injectés dans une gaine à l'intérieur de laquelle ils sont entraînés dans un flux liquide jusqu'à une cellule d'analyse à la sortie de laquelle ils passent un à un devant un faisceau laser qui excite les marqueurs fluorescents. Chaque noyau fluorescent est compté comme un événement d'une certaine intensité de fluorescence. La lumière émise est collectée et dirigée vers des détecteurs qui transforment les signaux lumineux optiques en signaux électroniques. La quantité d'ADN est proportionnelle au signal de fluorescence. Les résultats se présentent sous la forme d'histogrammes (nombre d'événements par niveau de fluorescence) (Figure 17b).

On a utilisé des rameaux végétatifs dans le cas des cyprès obtenus à partir de semis des années 2000 et 2001. Les déterminations du niveau de ploïdie pour chaque arbre ont été faites à partir des années 2001 et 2002, respectivement. Pour la plupart des plantules de cyprès obtenues à partir du semis de l'année 2005, la ploïdie a été déterminée sur un des cotylédons. Afin de libérer les noyaux des cellules, les échantillons frais (Figure 17c) ont été hachés individuellement avec une lame de rasoir sur des boîtes de Pétri contenant 1.5 ml de fluorochrome DAPI (Figure 17d). La solution ainsi obtenue a été filtrée à travers un filtre de 30µm pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le filtrat recueilli dans un tube (Figure 17e) a été analysé en utilisant un cytomètre en flux PARTEC (Ploidy Analyser PA - GmbH, Münster – Germany), équipé d'une lampe au mercure. Des échantillons issus de *C. sempervirens* et *C. dupreziana* ont été utilisés comme témoins diploïdes.

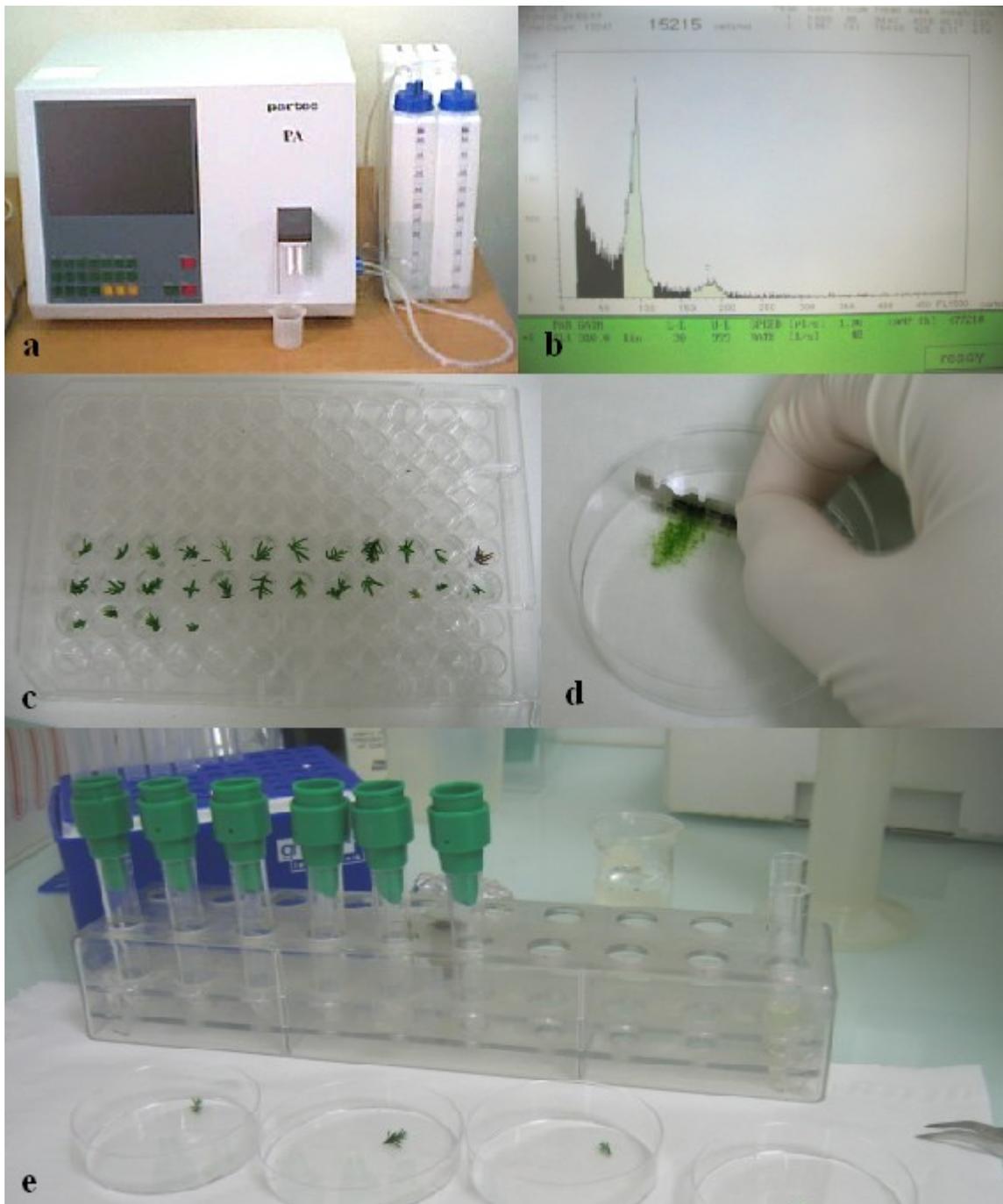


Figure 17. Estimation des niveaux de ploïdie des plantules de cyprès par cytométrie en flux. Cytomètre (a) et histogrammes observés sur son écran (b). Matériel végétal frais (c), hachage du tissu somatique afin de libérer les noyaux cellulaires dans le DAPI (d), et filtration de la solution obtenue avant d'être analysée dans le cytomètre (e).

2.2.2 Analyse des cyprès *Cupressus sempervirens* obtenus à partir du semis 2000

La première série de plantules obtenues à partir de graines récoltées sur des « mères » *Cupressus dupreziana*, soit dans l'aire naturelle soit en collection a fait l'objet d'analyse sur la morphologie, la ploïdie et les profils génétiques.

Les plantules issues de graines d'arbres *C. dupreziana in situ* ont présenté, comme attendu, la même morphologie que cette espèce et toutes ont été diploïdes. En revanche, les arbres mères *C. dupreziana ex situ* ont produit de nombreux descendants haploïdes qui ont tous présenté la morphologie du type *C. sempervirens*. D'autre part il y a eu la production de descendants diploïdes qui ont présenté soit la morphologie du type *C. dupreziana* ou du type *C. sempervirens*. Les cyprès appartenant à l'espèce *C. sempervirens*, particulièrement les haploïdes, ont exprimé de fortes anomalies morphologiques conduisant souvent à des phénotypes nains à port buissonnant.

L'effet de l'origine géographique des graines, obtenues de « mères » *C. dupreziana*, sur le phénotype et le niveau de ploïdie de la descendance, a été évalué en utilisant un modèle linéaire généralisé. Les profils génétiques de ces descendants, révélés à partir de marqueurs moléculaires AFLP (travail qui a été fait précédemment à ma thèse), ont été comparés avec ceux de 14 espèces de cyprès en collection INRA. Une analyse discriminante multivariée a été réalisée. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.

Les résultats sont présentés en détail dans l'article suivant :

Christian Pichot, Benjamin Liens, **Juana L. Rivera Nava**, Julien B. Bachelier and Mohamed El Maâtaoui. 2008. Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen. *Genetics* 178: 379 – 383.

Cypress Surrogate Mother Produces Haploid Progeny From Alien Pollen

Christian Pichot,^{*1} Benjamin Liens,^{*} Juana L. Rivera Nava,^{*} Julien B. Bachelier[†] and Mohamed El Maâtaoui[‡]

^{*}Unité de Recherches Forestières Méditerranéennes (UR 629), Institut National de la Recherche Agronomique, 84914 Avignon, France,

[†]UMR Botanique et Bioinformatique de l'Architecture des Plantes (AMAP), CIRAD/CNRS/INRA/IRD/Université Montpellier II, 34398 Montpellier, France and [‡]UMR 406 INRA/Université d'Avignon, 84914 Avignon, France

Manuscript received August 15, 2007

Accepted for publication October 24, 2007

ABSTRACT

Although most living organisms reproduce sexually, some have developed a uniparental reproduction where the embryo usually derives from the female parent. A unique case of paternal apomixis in plants has been recently reported in *Cupressus dupreziana*, an endangered Mediterranean conifer. This species produces unreduced pollen that develop into all-paternal embryos within the seed tissues. We analyzed seedlings produced by open-pollinated *C. dupreziana* seed trees using morphological descriptors, ploidy levels assessed through flow cytometry, and AFLP genetic diversity. *In situ C. dupreziana* seed trees (from Algeria) produced only diploid *C. dupreziana* progeny. In contrast, only one-third of the progeny produced by *ex situ C. dupreziana* seed trees planted in French collections were similar to *C. dupreziana* seedlings; the other progeny were haploid or diploid *C. sempervirens* seedlings. These results demonstrate that *C. dupreziana* ovules allow for the development of all-paternal embryos from pollen produced by another species, *C. sempervirens*. Thus, the *in planta* androgenesis is achieved through the combination of the embryogenic behavior of pollen grains and the ability of seed tree ovules to act as a surrogate mother. This phenomenon offers a unique opportunity to produce, by natural means, highly valuable material for genetic studies and selection of sterile cultivars.

SEXUAL reproduction is the general rule in higher plants and animals. More than 99% of multicellular eukaryotes reproduce sexually (BELL 1982; BARTON and CHARLESWORTH 1998; WEST *et al.* 1999). The sexual cycle follows the alternation of haploid and diploid cells delimited by meiosis and syngamy, two events that modify the nuclear chromosome number (VRIJENHOEK 1998). However, in some asexual species or lineages, the diploid embryo is of uniparental origin. In plants, at least 300 species in 40 angiosperm families (mainly Poaceae, Asteraceae, Rosaceae, and Rutaceae) exhibit patterns of apomixis where the embryo is derived solely from maternal tissue, either a somatic cell or a gamete with the somatic chromosome number (unreduced gamete) (VIELLE CALZADA *et al.* 1996). In rarer cases, the parthenogenetic development of a reduced gametophyte produces a haploid embryo (FOROUGH-WEHR and WENZEL 1993). This last feature, also called non-recurrent apomixis, occurs naturally in some female gametophytes. It is also intensively used in breeding programs through the *in vitro* culture of male gametophytes (androgenesis). Diploid homozygous genotypes can then be obtained through natural or artificial doubling of the chromosome number.

Until recently, apomixis had been reported only in Angiosperms. The highly endangered Mediterranean conifer, *Cupressus dupreziana* A. Camus (or Tassili cypress), is to our knowledge the first plant species where *in planta* "paternal apomixis" (*i.e.*, embryogenic development of diploid pollen in seed tissues) was hypothesized (PICHOT *et al.* 2000). This monoecious species is the most notable tree species of the mountainous region of the Tassili N'Ajjer plateau in the central Algerian Sahara desert (BALACHOWSKY 1955). The natural population today is reduced to 233 trees spread over 1200 km² on the southwestern border of the Tassili N'Ajjer plateau (≥ 1500 m above sea level) (ABDOUN and BEDDIAF 2002). Low accessibility due to high cliffs has contributed to protecting these trees from traditional harvesting for timber supply in Djanet and Ghat oases. In more accessible regions, overexploitation led to the extinction of the populations. Both extreme climatic conditions (the mean annual rainfall averages 30 mm) and a high human pressure may explain the very poor natural regeneration observed. The species produces unreduced diploid pollen whose embryogenic ability was demonstrated in interspecific pollinations; the controlled pollination of ovules of *Cupressus sempervirens* L. (or Mediterranean cypress) by pollen of *C. dupreziana* produces diploid embryos of *C. dupreziana* in *C. sempervirens* seeds (PICHOT *et al.* 2001). Reciprocally, we demonstrate here that the *C. dupreziana*

¹Corresponding author: URFM-INRA, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, 84914 Avignon, France. E-mail: christian.pichot@avignon.inra.fr

TABLE 1

Classification of cypress progeny produced by open-pollinated *C. dupreziana* seed trees on the basis of their morphological and genetic characteristics

Geographic origin	No. of seed trees	No. of seedlings	Morphology ^a	Ploidy ^b	AFLP profile ^c	Figure
<i>In situ</i> Tassili N'Ajjer, Algeria	6	38	Cd	2C	Cd	Figure 1A
<i>Ex situ</i> southeastern France	26	54	Cd	2C	Cd	Figure 1A
		32	Cs	2C	Cs	Figure 1B
		74	Cs	1C	Cs	Figure 1C

^a Cd, *C. dupreziana*-like with long and sharp juvenile leaves and light-green foliage; Cs, *C. sempervirens*-like with short juvenile leaves and dark-green foliage.

^b Relative DNA content revealed by flow cytometry as compared to diploid (2C) somatic tissues used as the control.

^c Based on a discriminant analysis of cypress species using 32 AFLP markers. Cd, *C. dupreziana* profile; Cs, *C. sempervirens* profile.

surrogate mother ability makes it possible to develop haploid embryos from reduced pollen produced by another cypress species. To our knowledge, this is the first report of natural *in planta* androgenesis in plants.

MATERIALS AND METHODS

Seedling production: Seed lots were collected from 6 open-pollinated *in situ* *C. dupreziana* trees (Tassili N'Ajjer desert, Algeria) and from 26 open-pollinated *C. dupreziana* trees from four southeastern France, *ex situ*, cypress collections (Carpentras, 1 seed tree; Estérel, 18 seed trees; Montpellier, 5 seed trees; and Ruscas, 2 seed trees. *Ex situ* collections contained other cypress species that may have contributed to pollination. Seeds were sown in petri dishes and germinating seeds were transplanted in 400 cm³ containers and cultivated in nursery.

Morphological observations and ploidy level: Number of cotyledons, length and shape of juvenile leaves, and foliage color were recorded on 4-month-old seedlings to discriminate *C. dupreziana* and *C. sempervirens* phenotypes. Seedling ploidy level was assessed by flow cytometry. Nuclei of fresh somatic tissues were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and analyzed using a PARTEC Ploidy Analyser PA following the protocol described by PICHOT and EL MAËTAOUI (2000).

The effect of seed tree geographic origin on the proportion of the different phenotypes and ploidy levels of the progeny was tested using a generalized linear model with the logit link function (COLLETT 1991). Statistical analyses were performed with the R software (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2004).

Genetic diversity: To infer the genetic origin of the seedlings, we compared their genetic patterns revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Vos *et al.* 1995) to those of 14 cypress species available from INRA (French National Institute for Agricultural Research) collections: *C. sempervirens* (7 samples), *C. atlantica* (5), *C. dupreziana* (43), *C. arizonica* (5), *C. goveniana* (5), *C. forbesii* (4), *C. lusitanica* (5), *C. macnabiana* (2), *C. macrocarpa* (5), *C. benthamii* (5), *C. funebris* (5), *C. cashmeriana* (5), *C. chengiana* (5), *C. torulosa* (5). AFLP analysis was conducted using the protocol (slightly modified) of ZABEAU and VOS (1993). DNA was digested with *EcoRI* and *MseI* restriction enzymes. Amplifications were performed using a Gradient 96 Stratagene (La Jolla, CA) Robotcyler. Selective amplifications were performed using *EcoRI* + ACG and *MseI* + CAG primer pairs. Silver staining was conducted according to the procedure (slightly modified) described by CRESTE *et al.* (2001). The presence/absence of AFLP marker bands was scored for all individuals.

The individual AFLP profiles of the seedlings were plotted as supplemental points on the plane defined by the first two axes of the discriminant analysis performed on the genetic profiles of the cypresses used as the control (14 species). The discriminant multivariate analysis was performed using the Multidim package (CARLIER and CROQUETTE 2002) within the R software.

RESULTS

Characteristics of control cypress species used for the identification of the progeny are described first. Progeny features are then reported and summarized in Table 1.

Morphological characteristics and ploidy level of the controls: The embryos of Mediterranean and Asian species have two or, more rarely, three cotyledons while American species have three to five cotyledons. Juvenile leaves of *C. dupreziana* seedlings are longer and sharper than those of *C. sempervirens*. *C. dupreziana* foliage has a lighter green color. All cypress species used as the control were diploid and exhibited similar DNA contents in flow cytometry measurements.

AFLP pattern of the controls: Genetic diversity was estimated with 32 polymorphic AFLP markers. The discriminant analysis of AFLP profiles for the control species (106 individuals) clearly discriminated their three main geographic origins—America, Asia, and the Mediterranean basin—and also led to a clear differentiation among Mediterranean species. Moreover, five AFLP bands were diagnostic markers for *C. sempervirens* (one band) and *C. dupreziana* (four bands). A nuclear biparental inheritance is usually reported for AFLP markers (LERCETEAU and SZMIDT 1999; KAKEHI *et al.* 2005). A nuclear inheritance was also demonstrated for 6 of our 32 markers by analyzing segregation of AFLP bands in progeny produced by *C. sempervirens*-controlled crosses (data not shown). The 26 remaining markers were not analyzable due to the lack of polymorphism.

Characteristics of the progeny from *in situ* *C. dupreziana* seed trees (Table 1): All 38 seedlings produced by the six *in situ* *C. dupreziana* seed trees had two

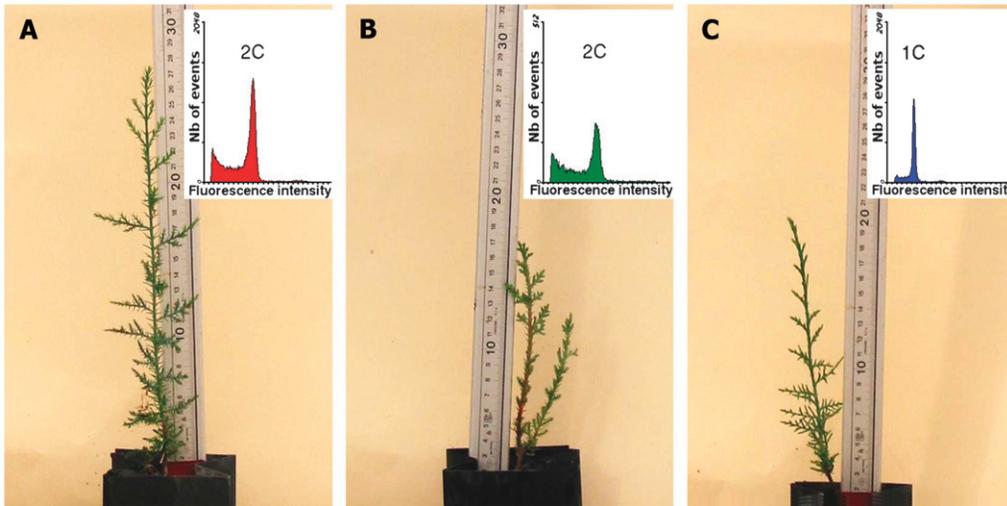


FIGURE 1.—Morphology and ploidy of the progeny produced by open-pollinated *C. dupreziana* seed trees. (A) Diploid *C. dupreziana* phenotype from *in situ* and *ex situ* seed trees. (B) Diploid *C. sempervirens* phenotype from *ex situ* seed trees. (C) Haploid *C. sempervirens* phenotype from *ex situ* seed trees.

cotyledons and exhibited a *C. dupreziana* phenotype (Figure 1A). Their relative fluorescence intensity peaks corresponded to those of somatic diploid tissues used as the control. AFLP patterns of these seedlings matched those of *C. dupreziana* controls.

Characteristics of the progeny from *ex situ* *C. dupreziana* seed trees (Table 1): Within the 160 seedlings produced by the *ex situ* open-pollinated *C. dupreziana* seed trees, two contrasted phenotypes were observed. A typical *C. dupreziana*-like phenotype was observed for 54 seedlings (Figure 1A) and a *C. sempervirens*-like phenotype was observed for 106 seedlings. *C. dupreziana*-like seedlings had two cotyledons except for one with three cotyledons. They were diploid and had AFLP profiles like *C. dupreziana* (Figure 2).

Most of the *C. sempervirens*-like seedlings had reduced growth and sometimes exhibited an unusual bushy shape. About one-third (32 of 106) of these seedlings were diploid (Figure 1B). They had two cotyledons, except for one with three cotyledons. The remaining two-thirds produced peaks of fluorescence intensity corresponding to half the diploid DNA amount and were consequently considered as haploid (Figure 1C). All haploid seedlings had two cotyledons. Irrespective of their ploidy

levels, all *C. sempervirens*-like seedlings exhibited AFLP profiles that matched those of the *C. sempervirens* control trees (Figure 2). Almost all *ex situ* *C. dupreziana* seed trees produced haploid seedlings. Only five seed trees, with a very low number of seedlings (four with one and one with three), produced only diploid progeny.

The proportion of *C. sempervirens*-like progeny *vs.* *C. dupreziana*-like progeny varied strongly from one site to the other, but the proportion of haploid seedlings within the *C. sempervirens*-like progeny was less variable (Table 2).

DISCUSSION

All-paternal genetic origin of the seedlings: The morphological and genetic characteristics of the *C. sempervirens*-like progeny produced by *ex situ* *C. dupreziana* seed trees indicate a strictly paternal origin of these seedlings. This result confirms the ability of cypress pollen to produce an embryo within the seed tissues of another cypress species but without genetic contribution of the seed tree, as reported when *C. sempervirens* seed trees were pollinated by *C. dupreziana* pollen (PICHOT *et al.* 2001). The androgenetic process occurred from

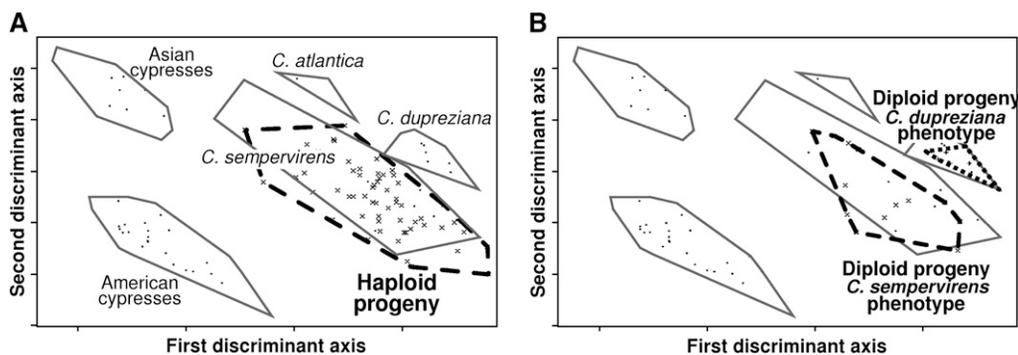


FIGURE 2.—Investigation of the genetic origin of progeny using AFLP markers. Only progeny produced by *C. dupreziana* seed trees planted in *ex situ* collections were studied. The individual genetic profiles were plotted as supplemental points on the plane defined by the first two axes of a discriminant analysis of cypress species used as a control (the three Mediterranean species

C. sempervirens, *C. atlantica*, and *C. dupreziana*; one American cypress group; and one Asian cypress group). All haploid progeny (A) were assigned to *C. sempervirens*. For diploid progeny (B), the genetic assignment either to *C. dupreziana* or to *C. sempervirens* was fully consistent with the classification based on the morphological type (Table 1, Figure 1).

TABLE 2

Variability of the proportion of the different phenotypes and ploidy levels according to the geographic origin of the seed trees

	<i>Ex situ C. dupreziana</i> collection				P-value ^a
	Carpentras	Estérel	Montpellier	Ruscas	
No. of seedlings	17	84	41	18	
% of <i>C. sempervirens</i> -like progeny	41	90	34	50	4.6×10^{-11}
% of haploid cypresses within <i>C. sempervirens</i> -like progeny	100	70	50	78	5.2×10^{-2}

All seed trees were open-pollinated *C. dupreziana* cypresses planted in the *ex situ* collection in southeastern France.

^aProbability of the observed proportions assuming no site effect and computed from a logit generalized linear model.

unreduced diploid pollen of *C. dupreziana* (PICHOT and EL MAËTAOUI 2000; EL MAËTAOUI and PICHOT 2001) and all the progeny from *C. sempervirens* seed trees were diploid. In contrast, *C. sempervirens* produces haploid pollen grains and both haploid and diploid *C. sempervirens*-like progeny were produced from *ex situ*, open-pollinated *C. dupreziana* seed trees. The haploid progeny would thus directly derive from the embryogenic development of the microgametophytes, initiated by haploid *C. sempervirens* pollen grains in a way similar to that of the diploid *C. dupreziana* microgametophytes, which produce diploid androgenic embryos. We demonstrate that the diploid progeny were pure *C. sempervirens* genotypes. However, an origin from unreduced gametes seems unlikely since no diploid nuclei were observed in *C. sempervirens* mature pollen (PICHOT and EL MAËTAOUI 2000). They could derive either from the fusion of two male gametes or from the early natural diploidization of the haploid embryo. The reduced growth and the abnormalities observed in most of the diploid *C. sempervirens*-like seedlings support the diploidization hypothesis or the fusion of two genetically identical gametes (*i.e.*, deriving from the same pollen grain). Indeed, it is well known that homozygosity produces inbreeding depression in allogamous species (CHARLESWORTH and CHARLESWORTH 1987). Complementary genetic analyses using codominant nuclear markers are planned to check for the putative homozygosity of these progeny.

Species compatibility: Although *C. dupreziana* seed trees planted in French cypress collections were surrounded by many other cypress species, all the seedlings deriving from alien pollen were *C. sempervirens* trees. It must be stressed that no seedlings from American cypress species were observed although many *C. dupreziana* seed trees were close to *C. arizonica* cypresses and that their flowering periods clearly overlap (PICHOT 2000). The large genetic distance between these species as compared to the proximity between the two Mediterranean species may explain this feature. According to recent studies, the genus Cupressus is paraphyletic

(LITTLE *et al.* 2004; LITTLE 2006). Cypresses from the New World, now recombined into the genus Callitropsis, and cypresses from the Old World (Mediterranean and Asian species), keeping the genus name Cupressus, do not share the same phylogenetic origin.

Significant variation in the proportion of *C. sempervirens*-like *vs.* *C. dupreziana*-like progeny observed among sites (Table 2) may be due to the relative contribution of the two species to the pollen cloud. Indeed, the highest rate of *C. sempervirens*-like progeny was observed in seeds collected from the Estérel plantation where *C. dupreziana* seed trees are the smallest and have a very low pollen production.

Conditions for natural androgenesis: Although the production of all-maternal progeny by apomixis or parthenogenesis is a rather frequent phenomenon, the production of all-paternal progeny has been very rarely reported (McKONE and HALPERN 2003). In animals, it has been reported to occur naturally in freshwater clams (*Corbicula* genus) (KOMARU *et al.* 1998) and in interspecific hybrids of the Sicilian stick insect *Bacillus rossius-grandii* (TINTI and SCALI 1995). It was also observed in *Drosophila melanogaster* mutants (KOMMA and ENDOW 1995) and following fish egg irradiation (ARAKI *et al.* 1995). To our knowledge, *C. dupreziana* is the only plant in which progeny are produced by the apomictic development of pollen grains. The scarcity of androgenic cases reported compared to the amount of gynogenic case reports may be explained not only by the probable evolutionary dead end of this reproductive process but also by the difficulty in detecting it (McKONE and HALPERN 2003). The male component ability to produce an embryo without female gamete contribution may not be so rare. In fact, it is intensively used in Angiosperms to produce haploid genotypes from *in vitro* culture of immature anthers. Thus, favorable growth conditions combined with a lack of syngamy opportunity may often lead to androgenesis. Such conditions occur naturally in the *C. dupreziana* × *C. sempervirens* cross-pollination system due to the production of unreduced diploid male and female spores

in *C. dupreziana* (PICHOT *et al.* 1998; PICHOT and EL MAËTAOUI 2000).

Consequences for *C. dupreziana* genetic preservation:

Natural production of *C. sempervirens* cypresses by *C. dupreziana* seed trees is an unusual type of genetic pollution although it is, according to our observations, restricted to seed admixture and does not include hybridization. The apomictic reproductive process protected the species from extinction for millennia and today prevents it from interspecific hybridization. This feature greatly facilitates the genetic conservation of the Tassili cypress and its safe propagation by seeds. However, only seeds collected from *C. dupreziana* seed trees that are very distant from other cypress species can be considered as pure *C. dupreziana* seeds. In other cases, seedling phenotype has to be checked to eliminate all non-*C. dupreziana* individuals, even if these alien seedlings probably would have been naturally counterselected due to the expression of deleterious genes. Unfortunately, this short-term advantage is also a long-term dead end as there is no more possibility for genetic evolution.

Production of haploid genotypes: Our findings also demonstrate the opportunity to produce haploid genotypes in *C. sempervirens* species. This material is highly valuable for genetic studies and mapping, especially in *C. sempervirens* where the tetrasporic origin of the megagametophyte (EL MAËTAOUI *et al.* 1998) prevents analysis of marker segregation as usually performed in conifers (WU *et al.* 1999). Finally, the highly probable sterility of the haploid genotypes offers a unique opportunity of producing cone-free cultivars. This may be very attractive in practical terms since the heavy production of female cones depreciates the aesthetic value of ornamental cypresses, while pollen produced by male cones causes severe pollinosis in Mediterranean regions (CHARPIN *et al.* 2005).

We thank F. Abdoun, G. Bettachini, P. Brahic, W. Brunetto, B. Jouaud, and J. Thévenet for their contribution to seed collection, seedling culture, and DNA marker experiments. We also thank two anonymous reviewers for their valuable comments.

LITERATURE CITED

- ABDOUN, F., and M. BEDDIAF, 2002 *Cupressus dupreziana* A. Camus: répartition, dépérissement et régénération au Tassili n'Ajjer, Sahara central. *C. R. Acad. Sci. III* **325**: 617–627.
- ARAKI, K., H. SHINMA, H. NAGOYA, I. NAKAYAMA and H. ONOZATO, 1995 Androgenetic diploids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced by fused sperm. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **52**: 892–896.
- BALACHOWSKY, A. S., 1955 Une relique rarissime du Sahara central: Le cyprès de Duprez. *La Nature* **3237**: 20–24.
- BARTON, N. H., and B. CHARLESWORTH, 1998 Why sex and recombination? *Science* **281**: 1986–1990.
- BELL, G., 1982 *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. University of California Press, Berkeley, CA.
- CARLIER, A., and A. CROQUETTE, 2002 Multidim, nouvelles fonctions pour l'analyse des données multidimensionnelles sous Splus, Version 2.2. Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- CHARLESWORTH, D., and B. CHARLESWORTH, 1987 Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 237–268.
- CHARPIN, D., M. CALLEJA, C. LAHOZ, C. PICHOT, and Y. WASEL, 2005 Allergy to cypress pollen. *Allergy* **60**: 293–301.
- COLLETT, D., 1991 *Modelling Binary Data*. Chapman & Hall, London.
- CRESTE, S., A. TULMANN-NETO and A. FIGUEIRA, 2001 Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* **19**: 299–306.
- EL MAËTAOUI, M., and C. PICHOT, 2001 Microsporogenesis in the endangered species *Cupressus dupreziana* A. Camus: evidence for meiotic defects yielding unreduced and abortive pollen. *Planta* **213**: 543–549.
- EL MAËTAOUI, M., C. PICHOT, H. ALZUBI and N. GRIMAUD, 1998 Cytological basis for a tetrasporic origin of megagametogenesis and its implications in genetic studies. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 776–779.
- FOROUGH-WEHR, B., and G. WENZEL, 1993 Andro- and parthenogenesis, pp. 261–277 in *Plant Breeding: Principles and Prospects*, edited by M. D. HAYWARD, N. O. BOSEMARK, and I. ROMAGOSA. Chapman & Hall, London.
- KAKEHI, Y., K. NAKAYAMA, K. WATANABE and M. NISHIDA, 2005 Inheritance of amplified fragment length polymorphism markers and their utility in population genetic analysis of *Plecoglossus altivelis*. *J. Fish Biol.* **66**: 1529–1544.
- KOMARU, A., T. KAWAGISHI and K. KONISHI, 1998 Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. *Dev. Genes Evol.* **208**: 46–50.
- KOMMA, D. J., and S. A. ENDOW, 1995 Haploidy and androgenesis in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11884–11888.
- LERCETEAU, E., and A. E. SZMIDT, 1999 Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. *Heredity* **82**: 252–260.
- LITTLE, D. P., 2006 Evolution and circumscription of the true cypresses (Cupressaceae: Cupressus). *Syst. Bot.* **31**: 461–480.
- LITTLE, D. P., A. E. SCHWARZBACH, R. P. ADAMS and C. F. HSIEH, 2004 The circumscription and phylogenetic relationships of *Callitropsis* and the newly described genus *Xanthocyparis* (Cupressaceae). *Am. J. Bot.* **91**: 1872–1881.
- MCKONE, M. J., and S. L. HALPERN, 2003 The evolution of androgenesis. *Am. Nat.* **161**: 641–656.
- PICHOT, C., 2000 Variabilité de la pollinisation et du pollen chez les cyprès. *Allerg. Immunol.* **32**: 132–133.
- PICHOT, C., and M. EL MAËTAOUI, 2000 Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. *Theor. Appl. Genet.* **101**: 574–579.
- PICHOT, C., A. BORRUT and M. EL MAËTAOUI, 1998 Unexpected DNA content in the endosperm of *Cupressus dupreziana* A. Camus seeds and its implications in the reproductive process. *Sex. Plant Reprod.* **11**: 148–152.
- PICHOT, C., B. FADY and I. HOCHU, 2000 Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryo. *Ann. For. Sci.* **57**: 17–22.
- PICHOT, C., M. EL MAËTAOUI, S. RADDI and P. RADDI, 2001 Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* **412**: 39.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2004 *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- TINTI, F., and V. SCALI, 1995 Allozygic and cytological evidence for hemiclinal, all-paternal, and mosaic offspring of the hybridogenetic stick insect *Bacillus rossius-grandii grandii*. *J. Exp. Zool.* **273**: 149–159.
- VIELLE CALZADA, J. P., C. F. CRANE and D. M. STELLY, 1996 Apomixis: the asexual revolution. *Science* **274**: 1322–1323.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. V. LEE *et al.*, 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407–4414.
- VRIJENHOEK, R. C., 1998 Clonal organisms and the benefits of sex. *Adv. Mol. Ecol.* **306**: 151–172.
- WEST, S. A., C. M. LIVELY and A. F. READ, 1999 A pluralistic approach to sex and recombination. *J. Evol. Biol.* **12**: 1003–1012.
- WU, R. L., D. M. O'MALLEY and S. E. MCKEAND, 1999 Understanding the genetic architecture of a quantitative trait in gymnosperms by genotyping haploid megagametophytes. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 1031–1038.
- ZABEAU, M., and P. VOS, 1993 Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *Pub. 0534858 A1*, Bulletin 93/13. European Patent Office, Munich.

Communicating editor: O. SAVOLAINEN

2.2.3 Le cas d'un cyprès triploïde

Au sein des individus de morphologie de type *C. dupreziana*, mis en plantation conservatoire au pied du Mont Ventoux a été récemment détecté un cyprès triploïde (Figure 18). La technique de cytométrie en flux a permis de mettre en évidence ce cyprès triploïde. Cet arbre a été obtenu à partir d'une graine issue de la pollinisation libre de *C. dupreziana* en collection *ex-situ* (semis de l'année 2000). Le pic correspondant à la fluorescence de l'ADN a été comparé avec les pics des cyprès : témoins, haploïdes et diploïdes appartenant à la même descendance (Figure 19).

L'origine de ce cyprès triploïde avec le phénotype de l'espèce *C. dupreziana* a été analysée avec 7 marqueurs moléculaires microsatellites (décrits dans la troisième partie de ce chapitre) pour comparer son profil génétique avec ceux des témoins (*C. dupreziana in-situ* et *ex-situ*, *C. sempervirens*). Pour le marqueur *cyp84* deux bandes ont été observées, la première bande correspond au profil des cyprès *C. dupreziana* et la deuxième bande au profil observé chez les cyprès *C. sempervirens*. Pour le marqueur *cyp174* trois bandes ont été observées, deux correspondent au profil des cyprès *C. dupreziana* et l'autre correspond au profil des cyprès *C. sempervirens*. Ces résultats témoignent de la possibilité d'une origine biparentale, c'est à dire que ce cyprès triploïde serait le résultat de la fusion d'un gamète diploïde de *C. dupreziana* avec un gamète haploïde de *C. sempervirens* et leur développement embryogénique. Le phénotype de cet individu est relativement proche de celui d'un cyprès *C. dupreziana*.



Figure 18. Cyprès triploïde obtenu lors du semis de l'année 2000. La graine est issue de la pollinisation libre de *Cupressus dupreziana* en collection *ex-situ* (arboretum de Ruscas).

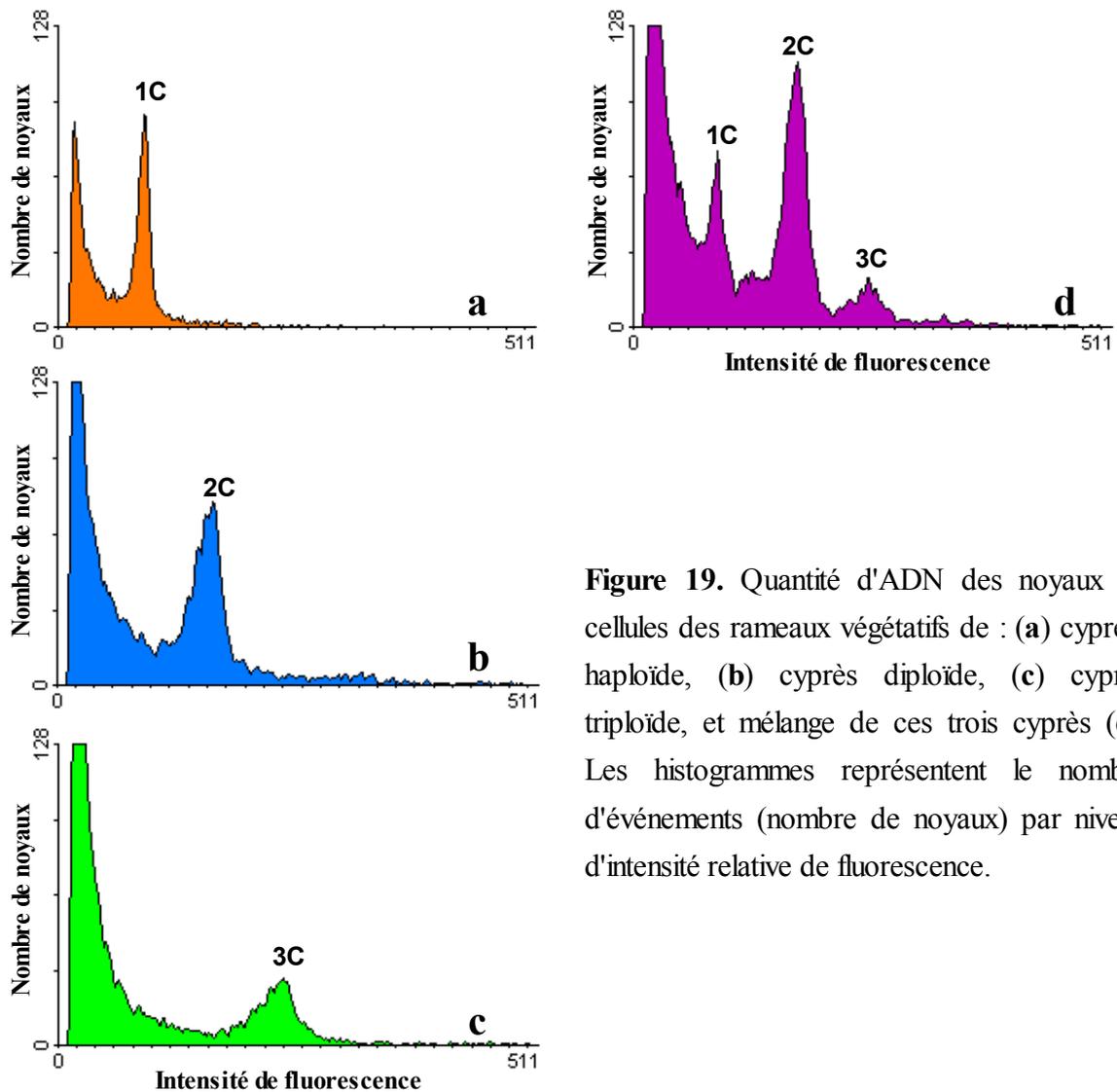


Figure 19. Quantité d'ADN des noyaux de cellules des rameaux végétatifs de : (a) cyprès haploïde, (b) cyprès diploïde, (c) cyprès triploïde, et mélange de ces trois cyprès (d). Les histogrammes représentent le nombre d'événements (nombre de noyaux) par niveau d'intensité relative de fluorescence.

2.2.4 Analyse des plantules issues des semis des années 2001 et 2005

Les résultats obtenus à partir de l'analyse du phénotype et des niveaux de ploïdie des plantules issues des semis des années 2001 et 2005 (Tableaux 7 et 8) ont permis de vérifier ceux premièrement trouvés à partir des observations du semis de l'année 2000. Le semis 2001 ayant produit 294 plantules, parmi lesquelles 187 ont été analysées. Dans le cas des plantules produites lors du semis de l'année 2005, seulement 361 des 563 repiquées en conteneurs WM de 600 cm³ ont été analysées (Figure 20).

Parmi les plantules de *Cupressus sempervirens* témoins obtenues lors du semis de l'année 2005, un était haploïde. En effet, le niveau de ploïdie de ce cyprès a été vérifié plusieurs fois par la cytométrie en flux. Malheureusement, la disparition de la pépinière de ce cyprès au début l'année 2007 ne nous a pas permis de continuer à l'étudier.

Tableau 7. Résultats obtenus de l'analyse du phénotype et de la ploïdie des plantules issues des semis 2001 et 2005.

Origine	<i>Cupressus dupreziana</i> en collections <i>ex-situ</i>						<i>Cupressus dupreziana</i> (collection de l'INRA) <i>ex-situ</i> Autopollinisation	<i>Cupressus dupreziana</i> <i>in-situ</i> Algérie	<i>Cupressus sempervirens</i> (collections INRA)	<i>Cupressus dupreziana</i> (collection de l'INRA) avec différentes modalités* de pollinisation avec le pollen de				
	Avignon	Carpentras	Estérel	Montpellier	Ruscas	+ <i>Cupressus sempervirens</i>				<i>Cupressus arizonica</i> ++	<i>Cupressus funebris</i> ++			
Année du semis	2005	2001	2001	2001	2005	2001	2005	2005	2005	2001	2005	2005	2005	2005
Nombre d'arbres mères impliqués	1	4	11	6	1x2	1	1x2	1x2	4	2	7	11	1	1
Plantules analysées	47	57	13	78	104	20	18	7	12	19	124	39	6	4
PCd - 2C	1	16	3	58	91	18	15	7	12	-	-	11	6	4
PCs - 1C	32	32	9	14	8	2	3	-	-	-	1	22	-	-
PCs - 2C	14	9	1	6	5	-	-	-	-	19	123	6	-	-

PCd – 2C = cyprès avec le phénotype de *Cupressus dupreziana* et diploïdes. PCs – 1C = cyprès avec le phénotype de *Cupressus sempervirens* et haploïdes. PCs – 2C = cyprès avec le phénotype de *Cupressus sempervirens* et diploïdes.

+ La plupart des pollinisations contrôlées, en utilisant des sacs de polyester, ont été faites avec 100% de pollen de *C. sempervirens*, et certains ont été faites avec du pollen mélangé : environ $\frac{3}{4}$ de pollen de *C. sempervirens* et $\frac{1}{4}$ de pollen de *C. dupreziana*. ++ Surpollinisation. * Détails présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Différentes pollinisations d'un cyprès *Cupressus dupreziana* en collection à l'INRA.

Code de la pollinisation	Pollen	Modalité	PCd - 2C	PCs - 1C	PCs - 2C
301	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.18)	Sac de polyester		1	
305	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.34)	Sac de polyester		8	3
308	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.32)	Sac de polyester		1	
309	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.32)	Sac de polyester		3	
310	Mélange : <i>Cupressus sempervirens</i> et <i>Cupressus dupreziana</i> (c.s.79 = 1.5 g et c.d. est = 0.6 g)	Sac de polyester	5		
311	<i>Cupressus dupreziana</i> (Autopollinisation)	Sac de polyester	1		
317	Mélange : <i>Cupressus sempervirens</i> et <i>Cupressus dupreziana</i> (c.s.79 = 1.5 g et c.d. est = 0.6 g)	Sac de polyester	1		
320	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.18)	Sac de polyester		1	1
326	<i>Cupressus dupreziana</i> (Autopollinisation)	Sac de polyester	6		
327	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.48)	Sac de polyester		3	2
329	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.47)	Sac de polyester		1	
A03-08	<i>Cupressus arizonica</i> (c.a.z2 n2)	Surpollinisation	6		
A03-09	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.47)	Surpollinisation	4		
A03-10	<i>Cupressus sempervirens</i> (c.s.47)	Surpollinisation	1	4	
A03-13	<i>Cupressus funebris</i>	Surpollinisation	3		
A03-14	<i>Cupressus funebris</i>	Surpollinisation	1		

PCd – 2C = cyprès avec le phénotype de *Cupressus dupreziana* et diploïdes. PCs – 1C = cyprès avec le phénotype de *Cupressus sempervirens* et haploïdes. PCs – 2C = cyprès avec le phénotype de *Cupressus sempervirens* et diploïdes.

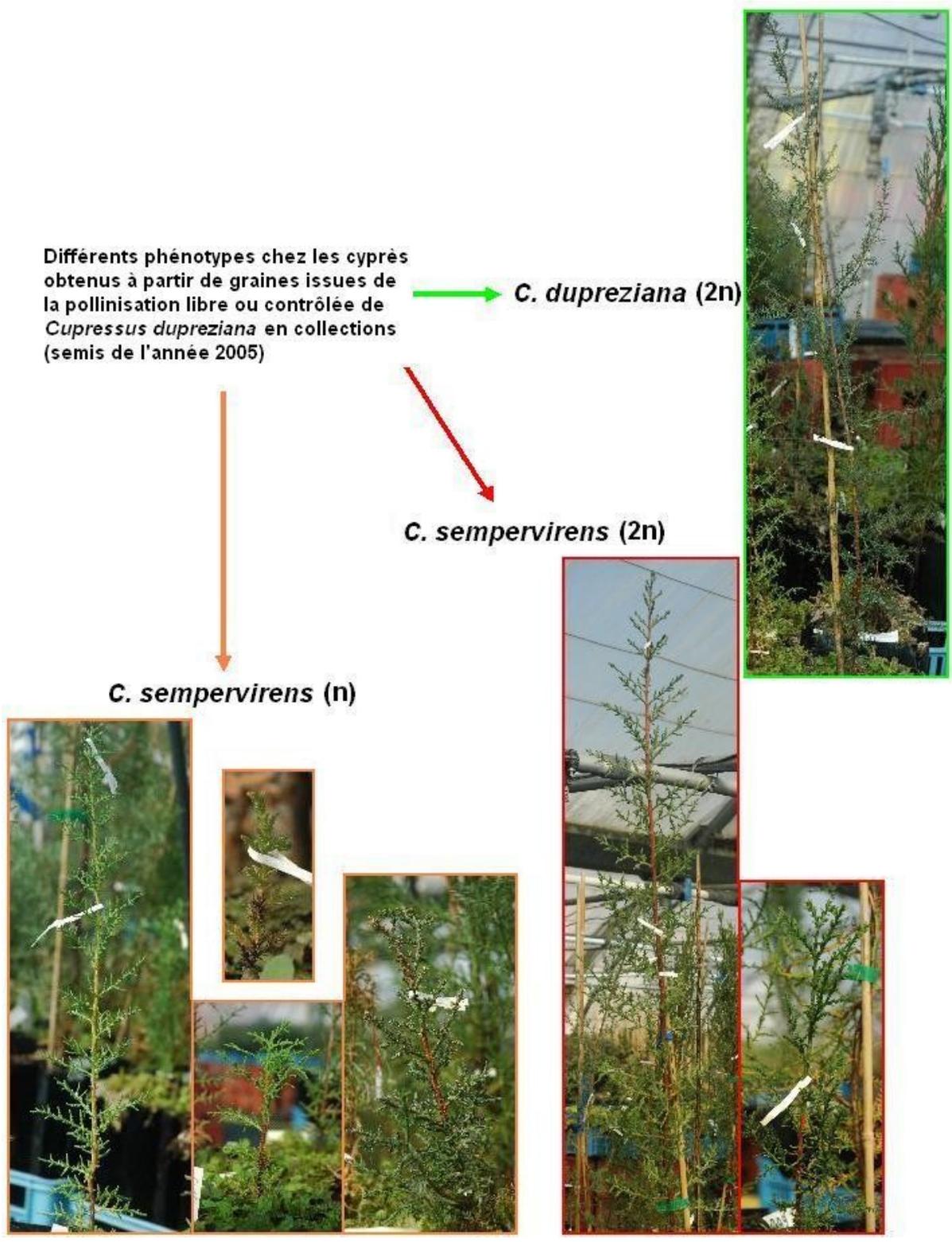


Figure 20. Types de cyprès selon leur morphologie et leur niveau de ploïdie.

2.2.5 Stabilité dans le temps du niveau de ploïdie des cyprès *C. sempervirens* haploïdes et test de doublement

Les cyprès *Cupressus sempervirens* haploïdes issus de « mères » *C. dupreziana* ont été suivis chaque année pour vérifier la stabilité dans le temps de leur niveau de ploïdie. L'ensemble des cyprès analysés, correspondant aux semis de trois années (2000, 2001 et 2005), n'a pas montré un doublement spontané du niveau de ploïdie.

D'autre part, on a évalué la possibilité de doubler le niveau de ploïdie *in-vivo* des cyprès haploïdes. Un protocole expérimental a été élaboré à partir des indications de la littérature (Petersen *et al.* 2003 ; Lotfi *et al.* 2003, Saradhuldhat et Silayoi 2001, Tosca *et al.* 1995, Ragot et Steen 1992, Wan *et al.* 1991, Wan *et al.* 1989), et deux inducteurs ont été testés : la colchicine et l'oryzaline. On a choisi 6 *C. sempervirens* haploïdes : 5 boutures et 1 greffe (collections INRA), qui sont des répliquats du cyprès nommé 8-34 d17 (semis 2000). L'application de ces inducteurs (d'une concentration de 0.3 %) a été faite par trempage (½ heure ou 1 heure) de rameaux sélectionnés contenant environ 30 apex chacun. En plus, deux applications de colchicine par goutte directement sur les bourgeons ont été réalisées en utilisant 3 concentrations : 0.3, 0.6 et 1.2 %. Dans ce cas, on a employé de l'huile minérale afin d'éviter l'évaporation de la colchicine et d'assurer son contact avec les bourgeons le plus longtemps possible. Le Tableau 9 est le résumé des traitements réalisés.

Les résultats obtenus dans cet essai *in-vivo* du doublement du niveau de ploïdie n'ont pas été favorables. Les rameaux traités par trempage dans la colchicine et l'oryzaline, après des analyses par cytométrie en flux, ont conservé leur état haploïde. Les rameaux pour lesquels l'application de colchicine a été faite par gouttes ont dépéris (Figure 21).

Tableau 9. Nombre de rameaux utilisés par traitement et par cyprès *C. sempervirens* haploïde.

Traitement	Quantité de rameaux					
	Greffe	Bouture 1	Bouture 2	Bouture 3	Bouture 4	Bouture 5
ATC => ½ heure	2	-	-	1	1	2
ATC => 1 heure	2	-	-	1	1	1
ATO => ½ heure	-	-	2	-	-	-
ATO => 1 heure	-	-	2	-	-	-
AGC => 0.3 %	2	2	-	1	-	-
AGC => 0.6 %	2	2	-	1	-	-
AGC => 1.2 %	2	2	-	1	-	-

ATC = Application par trempage de la colchicine à 3 % de concentration. ATO = Application par trempage de l'oryzaline à 3 % de concentration. AGC = Application par gouttes de la colchicine mélangé avec d'huile minérale.



Figure 21. Bouture avec dépérissement des rameaux qui ont suivi l'application par gouttes de la colchicine mélangé avec d'huile minérale.

2.2.6 Conclusion

Dans cette partie de la thèse, on a démontré la possibilité d'une production naturelle des cyprès *Cupressus sempervirens*, haploïdes et diploïdes, issus de « mères » *Cupressus dupreziana ex-situ* en collections. Les caractéristiques morphologiques et génétiques de ces cyprès ont conduit à la confirmation d'une origine strictement paternelle, c'est à dire par apomixie mâle. En effet, les résultats obtenus lors des trois semis réalisés les années 2000, 2001 et 2005 à partir de graines provenant soit de la pollinisation libre (Pichot *et al.* 2008) ou de pollinisations contrôlées (avec *C. sempervirens*) d'arbres *C. dupreziana*, confirment la capacité du pollen de cyprès vert à produire un embryon dans les structures reproductrices femelles d'une autre espèce de cyprès, mais sans contribution génétique de la « mère » porteuse, comme l'a indiqué le cas de la pollinisation de *C. sempervirens* par le pollen de *C. dupreziana* (Pichot *et al.* 2001). Le processus androgénétique s'est produit à partir du pollen non réduit (diploïde) de *C. dupreziana* (Pichot et El Maâtaoui 2000; El Maâtaoui et Pichot 2001), donnant une descendance diploïde de *C. dupreziana*. D'une forme similaire, la descendance des cyprès *C. sempervirens* haploïdes analysés dans le présent travail, a été développée androgénétiquement à partir du pollen haploïde de *C. sempervirens*. Par contre, la croissance réduite et les anomalies observées chez la plupart des cyprès *C. sempervirens* diploïdes indiquent qu'ils proviennent soit de la fusion de deux gamètes mâles génétiquement

identiques soit de la diploïdisation naturelle de l'embryon haploïde. Les fortes anomalies morphologiques exprimées pour la descendance de cyprès *C. sempervirens* (haploïdes ou diploïdes) issue de « mères » *C. dupreziana*, sont l'expression des tares génétiques présentes naturellement chez cette espèce et ici révélées en raison de l'état haploïde ou diploïde probablement homozygote. En effet, il est bien connu que l'homozygotie produit une dépression de consanguinité chez les espèces allogames (Charlesworth et Charlesworth 1987).

L'ensemble des cyprès obtenus à partir de graines récoltées *in-situ* sur des arbres *C. dupreziana* pollinisés librement, a présenté la morphologie ou le phénotype habituel du cyprès du Tassili. De plus, il n'y a eu aucun cyprès haploïde parmi ces semis. Ces résultats sont raisonnables si on considère l'aire naturelle de l'espèce où la population de cyprès n'est pas exposée au flux de pollen provenant d'autres espèces de Cupressacées, c'est à dire que la pollinisation reste intraspécifique. En revanche, l'apparition d'un cyprès *C. sempervirens* haploïde issu d'une graine récoltée sur cette même espèce peut s'expliquer comme le développement de l'embryon soit par gynogenèse soit par androgenèse. La disparition prématurée de cet individu de la pépinière ne nous a malheureusement pas permis de tester ces hypothèses à l'aide de marqueurs moléculaires.

Le cas du cyprès triploïde avec le phénotype proche de l'espèce *C. dupreziana* reste toutefois particulier et de grande valeur, non seulement du point de vue de l'obtention de clones stériles, mais aussi pour effectuer des analyses d'expression génétique, ainsi que des analyses au niveau de sa reproduction sexuée qui devrait être suivie.

Tous les cyprès haploïdes ont montré une stabilité « naturelle » de leur niveau de ploïdie, y compris ceux utilisés dans le test de doublement du niveau de ploïdie *in-vivo*. Cette stabilité est effectivement importante si on envisage des études dirigées vers la création de variétés stériles. On recommande le suivi de ces cyprès utilisés pour l'essai de doublement afin de vérifier leur état de ploïdie. D'autre part, on devrait essayer un autre protocole en considérant une concentration supérieure à celle déjà utilisée (3 % dans le cas de trempage), en faisant varier le temps et le type d'application de l'inducteur choisi, et sans oublier de prendre en compte le fait qu'il est plus facile de manipuler des cyprès jeunes que des cyprès de grande taille.

Afin de vérifier l'homozygotie supposée des cyprès *C. sempervirens* diploïdes décrits précédemment, une analyse génétique par marqueurs nucléaires codominants est présentée dans la partie suivante de ce chapitre.

2.3 Évaluation de l'homozygotie ou hétérozygotie des cyprès *C. sempervirens* diploïdes

2.3.1 Analyse avec des marqueurs nucléaires microsatellites

Un individu diploïde homozygote possède deux allèles identiques sur les deux chromosomes homologues d'un même locus. Un taux élevé d'homozygotie est fréquemment trouvé chez les plantes autogames. Au contraire, l'hétérozygotie est favorisée par l'allogamie (ou fécondation croisée).

Les cyprès *Cupressus sempervirens* diploïdes (Figure 22) ici étudiés proviennent, la plupart, de graines collectées sur des arbres *Cupressus dupreziana* pollinisés librement. Avec la finalité d'éclaircir l'origine génétique des cyprès diploïdes, décrits précédemment, on fait, dans cette partie de la thèse, l'évaluation de l'état homozygote ou hétérozygote de ces individus en utilisant des marqueurs nucléaires microsatellites (nSSR) spécifiques de *C. sempervirens* (Sebastiani *et al.* 2005). Tout d'abord, l'hérédité mendélienne des marqueurs utilisés a été testée sur une descendance issue de croisements contrôlés, puis le taux d'homozygotie a été estimé. Par ailleurs, l'importance de l'obtention de lignes homozygotes a été abordée. Les détails sur l'échantillonnage, les marqueurs utilisés, les analyses statistiques ainsi que les résultats obtenus sont décrits dans l'article présenté ci-après.

Juana L Rivera Nava, Anna Buonamici, Giovanni G Vendramin, Christian Pichot. Molecular evidence for natural production of homozygous *Cupressus sempervirens* L. lines by *Cupressus dupreziana* A. Camus seed trees. Soumis à la revue Heredity.



Figure 22. Cyprès *Cupressus sempervirens* diploïdes en collection à l'INRA, issus de graines collectées sur des arbres *Cupressus dupreziana* pollinisés librement.

Molecular evidence for natural production of homozygous *Cupressus sempervirens* L. lines by *Cupressus dupreziana* A. Camus seed trees

Juana L Rivera Nava¹, Anna Buonamici², Giovanni G Vendramin², Christian Pichot¹

¹ INRA, Unité d'Ecologie des Forêts Méditerranéennes (UR629), Domaine Saint Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France

² Istituto di Genetica Vegetale, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna del Piano 10, 50019 Sesto Fiorentino Firenze, Italy

Corresponding author: Christian Pichot, INRA URFM, Domaine Saint Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France. Tel 33 4 32722966, email : pichot@avignon.inra.fr

Keywords: androgenesis, dihaploid, surrogate mother, SSR, conifer

Running title: Homozygous cypresses from *in planta* androgenesis

Word count (main text): 2907

Abstract

Paternal apomixis was recently reported in the endangered Mediterranean cypress, *Cupressus dupreziana*. This species acts as a surrogate mother for the development of all-paternal embryos from pollen grains. Production of haploid or diploid seedlings from *Cupressus sempervirens* pollen was also demonstrated. In order to determine the ontogenic origin of the diploid *C. sempervirens* seedlings, we analysed the heterozygosity of 63 diploid all-paternal *C. sempervirens* using highly variable codominant nuclear microsatellite markers for which bi-parental inheritance have been previously checked analyzing *C. sempervirens* controlled crosses. A high polymorphism was observed among the diploid all-paternal trees. Only 3 seedlings were scored as heterozygous at some loci. All other individuals exhibited single band profiles as expected for homozygotes, which origin could be from natural diploidisation of *C. sempervirens* haploid embryo or from the fusion of two male gametes produced by the same *C. sempervirens* microgametophyte. The rare heterozygous seedlings would be derived from the fusion of two male gametes produced by two different *C. sempervirens* microgametophytes. These findings offer a unique opportunity in conifers to produce homozygous lines, highly valuable for genetic analyses or breeding.

Introduction

Sexual reproduction is the general rule in higher plants and animals (Bell, 1982; Barton and Charlesworth, 1998; West *et al.*, 1999). However some species exhibit an apomictic or parthenogenetic reproduction where offspring derives from only one parent, the mother (Foroughi-Wehr and Wenzel, 1993). Very rare cases of androgenesis were already reported but *Cupressus dupreziana* A. Camus (Cupressaceae) is today the only plant species where "paternal apomixis" was observed (McKone and Halpern, 2003).

C. dupreziana (or Tassili cypress) is a highly endangered woody species. Only one natural population is known in the Tassili N'Ajjer desert, Algeria, and the number of surviving individuals is limited to 233 (Abdoun and Beddiaf, 2002). This species can easily be distinguished from *C. sempervirens* on the basis of the multi-locus profile determined using AFLP (Pichot *et al.*, 2008) and nuclear microsatellites (transferred from Sebastiani *et al.*, 2005) The extreme climatic conditions and the long term human pressure can explain the decrease of the species and the extremely scarce regeneration that is observed today. The species always exhibits a low rate of viable seeds which can be related to the abnormalities of its sexual reproductive process. Indeed the aberrant meiosis that occurs in both micro- and macro-spores leads to the development of diploid pollen (Pichot and El Maâtaoui, 2000) and diploid based megagametophyte (Pichot *et al.*, 1998). The embryogenic ability of *C. dupreziana* pollen was first demonstrated in inter specific pollination experiments. All progeny produced by controlled pollination of the Mediterranean common cypress (*Cupressus sempervirens* L.) using *C. dupreziana* pollen were pure *C. dupreziana* seedlings (Pichot *et al.*, 2001). Reciprocally, the ability of *C. dupreziana* to act as a surrogate mother for the development of all-paternal *C. sempervirens* progeny was more recently demonstrated (Pichot *et al.*, 2008). Indeed two-thirds of the seedlings produced by open pollinated *C. dupreziana* trees planted in South Eastern France collections were pure *C. sempervirens* individuals. Most of these seedlings were haploid which was consistent with the fact that they would derive from haploid *C. sempervirens* pollen grains, without fecundation. On the other hand, the remaining seedlings were diploid and their ontogenic origin remained unknown.

In the present paper we demonstrate, using nuclear microsatellite (SSR) markers, that all but very few of these diploid all-paternal (*C. sempervirens*) seedlings were homozygous and we discuss about their probable ontogenic origin. Testing of SSR marker inheritance was also performed.

Material and methods

Plant material used for Mendelian inheritance tests

The analysis of SSR marker inheritance was based on the genotyping of 77 *C. sempervirens* seedlings from 5 full-sib families, including two reciprocal crosses, and of the 6

parents of these crosses (Table 1). Leaf samples were collected from 5 years-old individuals planted in one progeny test near Avignon, South Eastern France.

Table 1. *C. sempervirens* seedlings genotyped for the microsatellite segregation analysis. Crosses are referred as female x male mating.

Crosses	Cs79 x Cs18	Cs32 x Cs129	Cs129 x Cs32	Cs48 x Cs62	Cs62 x Cs48
Number of seedlings	26	12	13	13	13

Plant material used for testing the origin of *C. sempervirens*-like progeny

In order to determine their genetic origin, 63 diploid all-paternal *C. sempervirens*-like seedlings originating from *C. dupreziana* seeds were analysed (Table 2). Seeds were collected between 1999 and 2004 and sown in 2000, 2001 or 2005. Most progeny came from open-pollinated *C. dupreziana* seed-trees planted in *ex-situ* collections (South Eastern France). Six progeny were produced by controlled pollinations of one *C. dupreziana* seed-tree with pollen collected from three *C. sempervirens* trees. Seedling ploidy level was assessed by flow-cytometry. Nuclei of fresh somatic tissues were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and analysed using a PARTEC Ploidy Analyser PA following the protocol described by Pichot and El Maâtaoui (2000).

This material represents about a quarter of the total progeny produced by the *ex-situ* *C. dupreziana* seed-trees. Others seedlings were either diploid *C. dupreziana* cypresses or haploid *C. sempervirens* ones (Pichot *et al.*, 2008).

Table 2. Origin and number of diploid all-paternal *C. sempervirens* progeny analysed with SSR markers.

Site	Avignon ¹	Carpentras ¹	Estérel ²		Montpellier ³			Ruscas ²		
Year of sowing	2005	2001	2000	2001	2000	2001	2005	2000	2001	2005
Number of <i>C. dupreziana</i> seed-trees	1	2	10	3	3	4	1	1	1	
Number of seedlings	14	10	12	3	7	5	4	1	1	6*

1 = Private collection; 2 = INRA *ex-situ* collections; 3 = Botanical Garden from Montpellier.

* Produced by controlled pollination.

Molecular markers

Seven nuclear microsatellites (nSSRs) recently developed for *Cupressus sempervirens*

(Sebastiani *et al.*, 2005) were used: *Cyp52*, *Cyp84*, *Cyp101*, *Cyp174*, *Cyp257*, *Cyp258* and *Cyp293*. These markers revealed a high polymorphism in *C. sempervirens* populations but segregation had not been checked (Valgimigli, 2005).

A first genotyping study was conducted for all samples used for the marker inheritance analysis and for 31 individuals deriving from the 2000 and 2001 sowings (A). Thirty two additional individuals from the 2000, 2001 or 2005 sowings were also genotyped (B). DNA was extracted from leaf samples using the DNeasy plant kit (QIAGEN). For the (A) samples, PCRs were performed in 25 µl containing 10 ng of DNA, 1 x PCR reaction buffer (Promega), 200 µM of each dNTP, 1 U Taq polymerase (GoTaq, Promega), 1.5 mM MgCl₂, and 0.2 µM of each primer. The forward primers were labelled with FAM, HEX or TAMRA. The PCR thermal profile (except for *Cyp258*, see Sebastiani *et al.*, 2005) was denaturation at 94 °C for 5min followed by 30 cycles of 94 °C 30s, 50 °C 30s, 72 °C 30s and final extension of 72 °C for 8 min. PCRs were performed using a Perkin-Elmer GeneAmp 9700 thermal cycler. The PCR products were separated by capillary electrophoresis, with a 400-bp size standard, using MEGABACE (GE Healthcare) automatic sequencer. Alleles were sized using FRAGMENT PROFILER version 1.2 (GE Healthcare).

For the (B) samples, three multiplex PCRs (QIAGEN): *Cyp52* (700nm) + *Cyp84* (800nm), *Cyp101* (700nm) + *Cyp174* (800nm), *Cyp257* and *Cyp258* (700nm) + *Cyp293* (800nm), were performed in 10 µl containing 0.2 µg of DNA, 5 µl of PCR Master Mix, 1µl of Primer Mix (0.2 µM each primer), 1 µl of Q-Solution and 1 µl of RNase-free water. Microsatellite loci were analysed on a LI-COR (4200 IR²) sequencer. Alleles sizes were determined automatically and (or) manually with the SAGA (LI-COR IR²) computer software.

A test across the two laboratories (CNR, samples (A) and INRA, samples (B)) was implemented by running the same PCR products on the different machines to verify the congruency of allele size estimation. These 19 samples, for which a perfect match of the length sizes of the amplified fragments was observed, were used as references in all runs allowing unambiguous comparison of the data obtained in the two labs.

Statistical analysis

A) Inheritance of markers

The segregations of the SSR alleles were analysed using the R statistical software (2006). Within full-sib progeny, the expected Mendelian segregation was checked by Monte Carlo simulations (1000 replicates). The probability of each observed segregation (p-value) was computed from the distribution of the simulated segregations under Mendelian inheritance.

B) Probability of SSR profiles

Hypothesizing a random mating of gametes, the probability of single band SSR profile

over all the 7 markers can be computed from the allele frequencies in the populations. Unfortunately, SSR allele frequencies have not been estimated in French cypress populations and data are only available for Italian populations (Valgimigli, 2005). According to previous results based on isozyme markers, French cypress populations exhibit similar amounts of genetic diversity as other Mediterranean natural or naturalized cypress populations (Dugas, 1996). Consequently we used the allele frequencies estimated in Italian populations for the computation of the probability of single band SSR profile. The probability $P(s_l)$ of a single band profile at locus l is the probability of two identical alleles (homozygosity) plus the probability of only one null allele:

$$P(s_l) = \sum_{i=1}^{\text{\# not null alleles}} P_i^2 + P_{null} \times (1 - P_{null})$$

where P_i is the frequency of the not null allele i and P_{null} the frequency of the null allele.

Hypothesizing no linkage disequilibrium among loci, the probability $P(s_{7l})$ of a single band profile over the 7 loci is:

$$P(s_{7l}) = \prod_{locus=1}^7 P(s_l)$$

Therefore the probability of observing n single band individuals among the 63 studied seedlings is:

$$C_{63}^n [P(s_{7l})]^n [1 - P(s_{7l})]^{63-n}$$

Results

A) Marker inheritance

Due to the lack of polymorphism at one SSR marker (*Cyp293*), segregations were analysed for only 6 of the 7 microsatellite loci. No significant differences between direct and reciprocal crosses were observed. Consequently all the progeny produced by the same couple of parents were pooled in order to increase the statistical power of the segregation tests.

Segregations were observed within all the 3 full-sib families for 4 loci (*Cyp84*, *Cyp101*, *Cyp257*, *Cyp258*) and within 2 full-sib families for 2 loci (*Cyp52*, *Cyp174*) (Table 3). The observed progeny profiles were always consistent to that of their 2 parents except for 4 cross x marker combinations where the presence of one null allele at one parent genotype was hypothesised. Mendelian segregation hypothesis was never rejected. The p-values computed from Monte Carlo simulations were very high except in two cases (cs79 x cs18 family for *Cyp101* and cs48 x cs62 family for *Cyp258*) where probabilities were respectively 8% and 17%.

Table 3. Analysis of SSR alleles segregation among *C. sempervirens* seedlings produced by controlled crosses.

Controlled crosses	Marker	Parent genotypes	Offspring				$\Sigma(O-E)^2/E$	* P value
			Genotype	Observed number (O)	Expected Mendelian segregation	Expected number (E)		
Cs79 x Cs18	<i>Cyp52</i>	174/174 x 174/174	174/174	26	---	---	---	---
	<i>Cyp84</i>	242/248 x 248/248	242/248 248/248	15 11	1 1	13 13	0,62	0,56
	<i>Cyp101</i>	182/184 x 184/184	182/184 184/184	18 8	1 1	13 13	3,85	0,08
	<i>Cyp174</i>	208/214 x 210/214	208/210 208/214 210/214 214/214	9 4 7 6	1 1 1 1	6,5 6,5 6,5 6,5	2,00	0,59
	<i>Cyp257</i>	163/183 x 163/null	163/163, 163/null 163/183 183/null	15 3 8	2 1 1	13 6,5 6,5	2,54	0,36
	<i>Cyp258</i>	226/226 x 226/230	226/226 226/230	15 11	1 1	13 13	0,62	0,56
	<i>Cyp293</i>	185/185 x 185/185	185/185	26	---	---	---	---
Cs129 x Cs32 Cs32 x Cs129	<i>Cyp52</i>	174/174 x 174/186	174/174 174/186	15 10	1 1	12,5 12,5	1,00	0,43
	<i>Cyp84</i>	244/248 x 248/null	244/null 244/248 248/248, 248/null	5 4 16	1 1 2	6,25 6,25 12,5	2,04	0,40
	<i>Cyp101</i>	182/184 x 184/null	182/null 182/184 184/184, 184/null	4 8 13	1 1 2	6,25 6,25 12,5	1,32	0,55
	<i>Cyp174</i>	208/208 x 214/214	208/214	25	---	---	---	---
	<i>Cyp257</i>	159/163 x 163/163	159/163 163/163	12 12	1 1	12 12	0,00	1,00
	<i>Cyp258</i>	226/234 x 230/242	226/230 226/242 230/234 234/242	7 6 8 4	1 1 1 1	6,25 6,25 6,25 6,25	1,40	0,76
	<i>Cyp293</i>	185/185 x 185/185	185/185	25	---	---	---	---
Cs48 x Cs62 Cs62 x Cs48	<i>Cyp52</i>	174/174 x 174/186	174/174 174/186	13 13	1 1	13 13	0,00	1,00
	<i>Cyp84</i>	242/248 x 242/248	242/242 242/248 248/248	5 14 7	1 2 1	6,5 13 6,5	0,46	0,87
	<i>Cyp101</i>	182/184 x 184/184	182/184 184/184	12 14	1 1	13 13	0,00	0,84
	<i>Cyp174</i>	208/208 x 208/214	208/208 208/214	15 11	1 1	13 13	0,62	0,56
	<i>Cyp257</i>	163/183 x 163/null	163/163, 163/null 163/183 183/null	12 6 8	2 1 1	13 6,5 6,5	0,46	0,88
	<i>Cyp258</i>	226/226 x 226/230	226/226 226/230	17 9	1 1	13 13	2,46	0,17
	<i>Cyp293</i>	185/185 x 185/185	185/185	26	---	---	---	---

* Probability of the observed segregation under Mendelian inheritance. Probability was computed from the distribution of simulated segregations (1000 Monte Carlo replicates)

B) SSR profiles of the *C. sempervirens* progeny produced by *C. dupreziana* seed-trees

Among the 63 analyzed diploid *C. sempervirens* seedlings originating from *C. dupreziana* seed-trees, 60 exhibited either single band or no band SSR profiles. Only 3 seedlings (one for each of the 3 sowing years) exhibited double band profiles at 2, 4 or 5 loci. Polymorphism among samples was very high. In all the 5 sites a high allele diversity was observed (Table 4). The number of alleles per locus varied from 6 to 8 and 95% of the genotypes (57/60) were observed in only one seedling, as expected considering the high mean number of allelic states at the 7 SSR loci. Only 3 genotypes were observed in 2 seedlings. The absence of bands at 3 loci (*Cyp101*, *Cyp257*, *Cyp293*) for respectively 4, 1 and 1 seedlings was attributed to the presence of two homologous null alleles (amplification of these samples was repeated three times).

The observed single band profiles may be attributed to homozygosity at all loci or to the presence of null alleles at heterozygous loci.

Table 4: Within site SSR allele polymorphism observed in the *Cupressus sempervirens* seedlings. Due to the all-paternal origin of the seedlings, this polymorphism is a sub sample of pollen tree diversity.

site	SSR markers						
	<i>Cyp52</i>	<i>Cyp84</i>	<i>Cyp101</i>	<i>Cyp174</i>	<i>Cyp257</i>	<i>Cyp258</i>	<i>Cyp293</i>
Avignon	174	242	182	208	159	226	185
1 seed tree	246	246	184	216	163	230	
14 seedlings		248	null		183	236	
		252				240	
						258	
Carpentras	174	242	182	208	159	226	183
2 seed trees	246	246	184	210	163	242	185
10 seedlings		248		214	165	258	
					183		
Estérel	146	226	182	196	159	226	165
10 seed trees	174	240	184	208	163	230	185
15 seedlings	186	242	null	214	165	242	187
	242	244		216	183		null
	246	248		218	null		
		252					
Montpellier	148	226	174	186	153	226	165
4 seed trees	174	232	180	208	159	230	167
16 seedlings	186	244	182	210	163	238	185
	240	246	184	214	165		187
	242	248	194	216			189
	246	252	204	218			
			null				
Ruscas	146	232	182	208	159	226	185
1 seed tree	174	242	184	214	163	230	187
8 seedlings	186	248		216	165		
	240	252					

Using the frequencies of not null and null alleles estimated by Sebastiani *et al.* (2005), in random mating populations the estimated probability of one single band genotype over 7 SSR loci is 0.005. Consequently the probability to observe 60 single band genotypes among

63 samples is close to zero ($3.4e-134$). Although there is no evidence for relaxing the hypothesis of linkage equilibrium, some disequilibrium would not strongly affect this computed probability.

Discussion

Inheritance and diversity of the SRR markers

The analysis of allele segregations in progeny produced by controlled crosses confirmed the putative Mendelian inheritance of the SSR makers developed by Sebastiani *et al.* (2005). Moreover, the absence of deviation from the 1:1 Mendelian expectation indicates the absence of significant allele selection. The high allelic polymorphism detected at 6 out of the 7 SRRs assayed in our study is in agreement with previous results reported for *C. sempervirens* populations (Valgimigli, 2005) and indicates that genetic diversity is high even in non natural planted populations. The high efficiency of nuclear SSR makers for the evaluation of heterozygosity (vs homozygosity) in diploids were already demonstrated in various species such as potato (Chani *et al.*, 2000), apple trees (Hofer *et al.*, 2002; Vanwynsberghe *et al.*, 2005) or maize (Fei Yu *et al.*, 2004).

The null allele frequency observed in our limited sample size of six *C. sempervirens* parents (4 among 72 = 5.5%) was of the same magnitude as that estimated by Sebastiani *et al.* (2005) on a larger sample size (from 0.06 to 0.19 for locus *Cyp52*, *Cyp139*, *Cyp258* and *Cyp293*). However, null alleles affected different loci in our sample (*Cyp84*, *Cyp101*, *Cyp257*) and their presence must be taken into account when generating population genetic parameters (Dakin and Avise, 2004; Hoffman and Amos, 2005).

Ontogenic origin of the diploid all-paternal *C. sempervirens* seedlings

The analysed seedlings were produced by open pollinated *C. dupreziana* seed trees, except for 6 seedlings deriving from controlled pollination with *C. sempervirens* pollen. A very high allele polymorphism was observed within each of the 5 locations and most genotypes were unique. These results indicate that numerous pollen trees contributed to the pollen clouds. Most of these progeny exhibited single band SSR profiles which is not compatible with a bi-parental origin. Indeed the high SSR allelic polymorphism observed within each stand (Table 4) makes it unlikely to get even one individual with a single band profile, assuming random mating of individuals. In addition, the null band frequency observed in these diploid progeny is close to the null allele frequencies reported in cypress populations. If panmixis occurred, the null band frequency in diploids would be the square of the null allele frequency. Moreover, the all-paternal origin of the seedlings led us to reject the hypothesis of a self pollination origin of the single band seedlings.

According to previous observations, *C. sempervirens* does not produce diploid pollen

(Pichot and El Maâtaoui, 2000). Consequently the all-paternal *C. sempervirens* homozygous seedlings are likely to derive from haploid pollen genotype, either by the diploidisation of an initially haploid embryo or by the fusion of two gametes produced by the same pollen grain. Indeed, in most conifers each haploid microgametophyte produces several males gametes through mitotic divisions (12 in *Cupressus arizonica* and 20 in *C. goveniana* according to Gaussen *et al.*, 1982). Excluding that mixture of seeds or labeling error occurred, the production of 3 heterozygous *C. sempervirens* diploids gives evidence for the fusion of 2 male gametes produced by two different pollen grains. However, the very low proportion of these heterozygous individuals (3/63) suggest that most of the homozygous *C. sempervirens* seedlings originate from the diploidisation of a haploid gamete. Therefore both processes of gamete fusion and of diploidisation could contribute to the production of diploid *C. sempervirens* from *C. dupreziana* seed-trees.

Interest for homozygous lines

Pure lines are intensively used for selective breeding purposes. They allow for a very efficient estimation of parent breeding additive value and trait heritability (Gallais, 1990; Bijma *et al.*, 1997). When fertile, they are easily multiplied and produce gametes with an invariable genotype allowing for the production of identical offsprings such as F1 hybrids. They are also of main interest in genetics mapping, QTL analysis (Picard *et al.*, 1994), greatly simplify genome sequencing (Komen and Thorgaard, 2007) and make it easier the study of gene expression because recessive alleles can not be masked by dominant ones as occurs at heterozygous loci (Fu and Jansen, 2006).

In the wild, diploid organisms generally originate from the sexual reproduction of two genetically distinct parents and are mostly heterozygous. In usual sexual reproduction, full homozygous individuals can only be produced either from homozygous parents by selfing or by cross-pollination within a pure line. For allogamous species, sexual reproduction between genetically related individuals reveals deleterious recessive mutations leading to inbreeding depression and natural selection acts as purging this genetic load (Charlesworth and Charlesworth, 1987; 1999; Keller and Waller, 2002). The reduced growth and survival rates observed in the diploid all-paternal *C. sempervirens* progeny as compared to wild *C. sempervirens* progeny used as control was attributed to this inbreeding depression (Pichot *et al.*, 2008). This hypothesis is now straightened by the good growth performances of the 3 heterozygous all-paternal *C. sempervirens* seedlings as compared to that of the homozygous diploids (Figure 1).

The artificial production of homozygous lines was historically based on several generations of selfing (that only halves the number of heterozygous loci at each generation) or mating between relatives when selfing is not possible. Today it mainly relies on the diploidisation of haploid lines produced by gyno- or andro-genesis from haploid tissues (Hosp *et al.*, 2007). According to Forster *et al.* (2007) 50% of the European barley cultivars are

produced via a doubled haploid system. In plants, most haploid lines derive from the *in vitro* culture of anthers or immature pollen grains. Haplo-diploid individuals are also produced in some animal species such as fishes, using irradiated gametes (Komen and Thorgaard, 2007). This strategy deeply shortens the breeding period especially for species exhibiting long term cycles. It is frequently used in Angiosperms (Forster 2007), including trees (Assani *et al.*, 2006; Germana, 2006; Bueno *et al.*, 2004) but did not succeed in Gymnosperms. In this paper, we demonstrate that a new strategy is available for *Cupressus sempervirens* to produce haploid or diploid homozygous lines by androgenesis in *C. dupreziana* surrogate mother. This strategy should improve the efficiency of future breeding programs for the production of ornamental or windbreak *C. sempervirens* varieties and could be tested in other related species. Our findings confirm the intrinsic embryogenic ability of pollen grains.

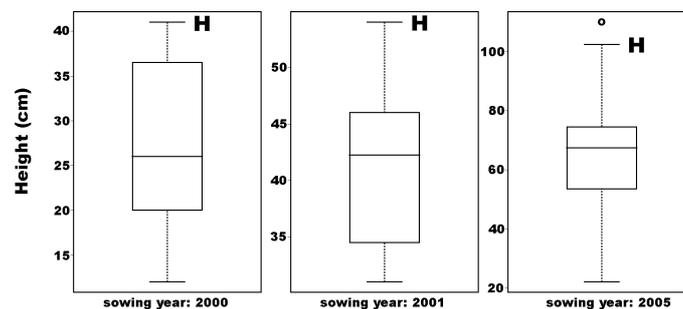


Figure 1. Total height of the all paternal *C. sempervirens* seedlings produced by *C. dupreziana* surrogate mothers. The 3 heterozygous seedlings (H) were the first or second best growers which suggests an inbreeding depression in homozygous seedlings. Seedlings from 2000 and 2001 were raised in nursery; seedlings from 2005 were raised in greenhouse.

Acknowledgements

We thank B. Jouaud, T. Langlois, J. Thévenet and A. Roig for their contribution to seedling production and SSR genotyping. We also thank B. Fady for valuable comments on the manuscript.

This study was partly supported by a PhD grant attributed to JL Rivera Nava by the CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico City, Mexico).

References

- Abdoun F, Beddiaf M (2002). *Cupressus dupreziana* A. Camus : répartition, dépérissement et régénération au Tassili n'Ajjer, Sahara central. *C R Biologies* **325**: 617-627.
- Assani A, Gupta B, Rajam MV (2006). Haploid production in trees, ornamental and floricultural plants. In: Teixeira da Silva JA (Ed) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. 646 p.
- Barton NH, Charlesworth B (1998). Why sex and recombination? *Science* **281**: 1986-1990.
- Bell G (1982). *The masterpiece of nature: The evolution and genetics of sexuality*. University of California Press: Berkeley, California.
- Bijma P, Arendonk JAM, Bovenhuis B (1997). Breeding value and variance component estimation from data coming containing inbred individuals: application to gynogenetic families in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetics* **145**: 1243-1249.

- Bueno MA, Pintos B, Prado MJ, Gomez A, Manzanera JA (2004). Androgenesis: a tool for woody plant breeding. In: Pandalai SG (ed) *Recent Research Developments in Genetics & Breeding*. Vol. 1, Part II, pp 365–383.
- Chani E, Veilleux RE, Boluarte-Medina T (2000). Improved androgenesis of interspecific potato and efficiency of SSR markers to identify homozygous regenerants. *Plant Cell Tiss Org Cult* **60**: 101-112.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Genet Res* **74**: 329–340.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu Rev Ecol Syst* **18**: 237–268.
- Dakin EE, Avise JC (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**: 504-509.
- Dugas V, (1996). Analyse de la variabilité enzymatique de 5 provenances naturelles et 10 provenances artificielles françaises de cyprés vert (*Cupressus sempervirens* L.). Rapport de stage de MST "Chimie et biologie végétales". Université Claude Bernard-Lyon I, 33 p.
- Fei Yu T, Fei D, GuoYing W (2004). Identification of doubled haploid plants from maize gynogenesis by SSR molecular marker. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* **26**: 859-862.
- Foroughi-Wehr B, Wenzel G (1993). Andro- and parthenogenesis. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (eds) *Plant Breeding: Principles and prospects*, Chapman & Hall: London. Pp 261-277.
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci* **12**: 368-375.
- Gallais A (1990). *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. Masson : Paris.
- Fu J, Jansen RC (2006). Optimal Design and Analysis of Genetic Studies on Gene Expression. *Genetics* **172**: 1993-1999.
- Gaussens H, Leroy JF, Ozenda P (1982). *Précis de botanique, Tome II : végétaux supérieurs*. Éd. Masson : Paris, p
- Germana M (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss Org Cult* **86**: 131-146.
- Hofer M, Gomez A, Aguiriano E, Manzanera JA, Bueno MA (2002). Analysis of simple sequence repeat markers in homozygous lines of apple. *Plant Breeding* **121**: 159–162.
- Hoffman JI, Amos W (2005). Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Mol Ecol* **14**: 599–612.
- Hosp J, de Faria Maraschin S, Touraev A, Boutilier K (2007). Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica* **158**: 275-285.
- Keller LF, Waller DM (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol Evol* **17**: 230–241.
- Komen J, Thorgard GH (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* **269**: 150-173.
- McKone MJ, Halpern SL (2003). The evolution of androgenesis. *Am Nat* **161**: 641-656.
- Picard E, Crambes E, Liu CS, Mihamou-Ziyyat A (1994). Evolution of doubled haploid methods and consequences for plant breeding. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* **188**: 109-141.
- Pichot C, Borrut A, El Maâtaoui M (1998). Unexpected DNA content in the endosperm of *Cupressus dupreziana* A. Camus seeds and its implications in the reproductive process. *Sex Plant Reprod* **11**: 148-152.
- Pichot C, El Maâtaoui M (2000). Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. *Theor Appl Genet* **101**: 574-579.
- Pichot C, El Maâtaoui M, Raddi S, Raddi P (2001). Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* **412**: 39.
- Pichot C, Liens B, Rivera Nava JL, Bachelier JB, El Maâtaoui M (2008). Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen. *Genetics* **178**: 379-383.
- R Development Core Team (2006). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sebastiani F, Buonamici A, Fineschi S, Racchi ML, Raddi P, Vendramin GG (2005). Novel polymorphic nuclear microsatellites in *Cupressus sempervirens* L. *Mol Ecol Notes* **5**: 393-394.
- Valgimigli MC (2005). *Genetic variability in Italian populations of Cupressus sempervirens L. assessed by SSR and RAPD markers*. PhD dissertation, Università degli Studi di Verona, Italy.
- Vanwynsberghe L, De Witte K, Coart E, Keulemans J (2005). Limited application of homozygous genotypes in apple breeding. *Plant Breeding* **124**: 399-403.
- West SA, Lively CM, Read AF (1999). A pluralistic approach to sex and recombination. *J Evol Biol* **12**: 1003-1012.

2.3.2 Conclusion

L'état homozygote supposé a été confirmé pour la plupart des cyprès analysés (60 / 63). En effet, les profils de ces individus ont montré une seule bande révélée par les marqueurs utilisés. En ce qui concerne leur origine génétique, l'embryon initialement haploïde développé à partir du pollen haploïde de *C. sempervirens* a du effectuer une diploïdisation, donnant par voie de conséquence des individus homozygotes. D'autre part, le fait de trouver trois cyprès *C. sempervirens* diploïdes hétérozygotes témoigne de la possibilité de fusion de deux gamètes mâles produits par deux types de grains de pollen. Il s'agirait donc du même processus que celui à l'origine du cyprès triploïde *C. dupreziana* (2n) x *C. sempervirens* (1n) (voir section 2.2.3).

Dans la reproduction sexuée habituelle, des individus homozygotes peuvent être produits à partir de parents homozygotes par autofécondation ou par la pollinisation croisée dans une ligne pure. Chez les espèces allogames qui ont une reproduction sexuée entre individus génétiquement liés, se présentent alors des mutations récessives délétères conduisant à une dépression de consanguinité. La croissance réduite et le taux de survie observés dans les cyprès *C. sempervirens* homozygotes, par rapport aux cyprès témoins provenant de graines de *C. sempervirens* sauvage, ont été attribués à la dépression de consanguinité.

Les résultats obtenus dans cette partie de la thèse montrent l'efficacité et l'utilité des marqueurs nucléaires spécifiques pour le genre *Cupressus* dans les analyses de ségrégation et les tests d'homozygotie. D'autre part, ces résultats confirment la capacité embryogénique intrinsèque du pollen de *C. sempervirens*, que pourraient aussi posséder les espèces proches de ce genre. L'obtention naturelle de cyprès homozygotes à partir de la stratégie « mère porteuse » devrait être évaluée sur d'autres espèces du même genre avec la finalité de développer des lignées.

2.4 Croissance et phyllotaxie des cyprès *C. sempervirens* haploïdes et diploïdes

Les premières plantules étudiées étaient issues de semis de graines effectués en 2000 et en 2001. Ces « premiers » cyprès nous ont permis de démontrer que le cyprès du Tassili était une mère porteuse pour le développement de cyprès vert haploïdes ou diploïdes homozygotes. Ces jeunes cyprès avaient été élevés dans des conditions trop peu contrôlées pour permettre une analyse fine de leur croissance et leur architecture. Aussi avons nous décidé d'installer un nouveau et véritable dispositif expérimental afin de comparer la croissance, la phyllotaxie et la ramification des différentes entités génétiques. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Sylvie Sabatier et Patrick Heuret (de l'Unité AMAP de Montpellier). Les observations et résultats sur la mort d'apex et la ramification ne sont pas inclus dans ce mémoire et seront analysés plus tard.

2.4.1 Introduction

Chez les plantes, l'allongement des axes est nommé croissance primaire et ce sont les méristèmes apicaux, situés à l'extrémité des racines et dans les bourgeons du système caulinaire, qui permettent cet allongement progressif (Campbell et Reece 2004). Ils produisent tous les organes de la plante et ils contrôlent la disposition spatiale des feuilles et des bourgeons sur les tiges. Les méristèmes apicaux qui se développent aux aisselles foliaires (dans l'angle délimité par les feuilles et les tiges) produisent des bourgeons axillaires qui peuvent à leur tour donner de nouveaux rameaux axillaires (Raven, Evert et Eichhorn 2000) ou des structures florales. Les plantes ligneuses ont en plus une croissance secondaire ou en épaisseur qui est le résultat de l'activité de méristèmes secondaires nommés cambiums (Campbell et Reece 2004).

Les analyses sur la croissance primaire des arbres ont une grande importance dans l'étude de la dynamique des populations, leur adaptation aux différentes conditions environnementales, et leur réponse aux différents traitements sylvicoles. La croissance primaire a été étudiée chez plusieurs espèces de conifères de l'hémisphère Nord (Baldwin 1931, Herman 1956, Kozlowski et Ward 1957, Pillai 1963, Walters et Soos 1963, Mitchell 1965, Cannell *et al.* 1976, Zobel 1983, Harry 1987), bien que l'on puisse aussi trouver des données concernant la croissance primaire de résineux originaires d'Amérique du Sud (Parker et Donoso 1993, Gobbi et Schlichter 1998, Grossfeld et Barthélémy 2004). Le modèle de croissance chez *C. sempervirens* a été décrit comme « potentiellement continu » et régulé par les conditions du milieu (Barthélémy *et al.* 1999, Stankova *et al.* 1999).

La phyllotaxie est la disposition des feuilles le long d'un axe. Elle est « alterne » s'il y a une feuille par nœud. Elle est « alterne distique » quand les feuilles successives se positionnent dans un même plan et forment un angle de 180° entre deux feuilles. A l'inverse, elle est « alterne spiralée » quand les feuilles se disposent autour de la tige. La phyllotaxie est « opposée » lorsque deux feuilles se présentent par nœud et sont sur un plan. La disposition est dite « opposée décussée » quand les paires de feuilles se présentent de façon perpendiculaire d'un nœud à l'autre. On parle de phyllotaxie « verticillée » quand plus de deux feuilles se présentent par nœud.

Chez les cyprès le premier nœud produit après les cotylédons porte en général le même nombre de feuilles. Sur le second nœud, la phyllotaxie est toujours verticillée par trois ou quatre. Au cours de l'ontogénie, les feuilles aciculaires et verticillées de la plante deviennent décurrentes et leur nombre par verticille décroît plus ou moins rapidement selon les individus (Camefort 1956, Rouanne 1973). Au stade adulte, la phyllotaxie est opposée décussée et les feuilles sont alors largement adhérentes et apprimées sur l'axe porteur (Camus 1914, Gausson 1968, Barthélémy *et al.* 1999).

Chez les cyprès, il n'y a pas d'étages de branches bien marqués, et la ramification est qualifiée de diffuse. Les rameaux se développent simultanément à l'allongement de l'axe porteur et sont qualifiés de rameaux à développement immédiat. Le long de l'axe, les rameaux sont disposés de manière régulière et la répartition des nœuds non ramifiés et ramifiés forment des motifs. Leur répétition détermine la forme des branches en disposant les rameaux dans le même plan ou dans des plans perpendiculaires (Guédon *et al.* 2001, Heuret 2002).

2.4.2 Matériel et méthodes

2.4.2.1 Matériel végétal

Un dispositif expérimental (Figure 23) a été établi fin août 2005 en conditions contrôlées à la pépinière des Milles près d'Aix en Provence. Il a été constitué par 240 plantules d'intérêt, plus 96 plantules de bordure, sélectionnées (le 28 juillet 2005) parmi les plantules obtenues à partir du semis réalisé au printemps 2005 (voir Tableau 5). Cinq types ou origines génétiques de cyprès sont étudiés (voir Tableau 7) :

- 1) *Cupressus dupreziana* témoins issus de graines récoltées en Algérie (Cd)
- 2) *Cupressus dupreziana* issus de graines récoltées dans des collections *ex-situ* (Cd-Ex)
- 3) *Cupressus sempervirens* haploïdes issus de graines récoltées sur des cyprès du Tassili (Cs-H)
- 4) *Cupressus sempervirens* diploïdes issus de graines récoltées sur des cyprès du Tassili

(Cs-D)

5) *Cupressus sempervirens* témoins issus de graines récoltées en France (Cs)

Les types 3 (*Cupressus sempervirens* haploïdes) et 4 (*Cupressus sempervirens* diploïdes) n'étaient pas toujours différenciés au moment de l'installation du dispositif car certaines plantules étaient trop petites pour prélever le matériel nécessaire pour la cytométrie en flux. Les effectifs par type ont été déterminés par la disponibilité en plantules et sont les suivants : 20 Cd ; 67 Cd-Ex ; 93 Cs-H ou Cs-D ; et 60 Cs.

Lors de la mise en place du dispositif les plantules ont été transplantées en conteneurs WM de 3 litres (Figure 23) afin de leur donner un espacement assez important dans les caisses et d'éviter la compétition aérienne. L'élevage en conteneurs individuels assure l'absence de compétition racinaire.



Figure 23. Jeunes cyprès en conteneurs WM de 3 litres (a). Dispositif expérimental au 25 avril 2006 (b), au 29 mai 2006 (c), et au 07 novembre 2006 (d).

Le dispositif expérimental était constitué de 42 caisses contenant chacune 8 plants dont 2 de bordures (Figure 24). Les caisses ont été constituées par tirage aléatoire de plantules mais en respectant, pour chacune des caisses, la composition suivante :

1 cyprès de Duprez *in-situ* ou *ex-situ* (Cd ou Cd-Ex) (total 40)

1 ou 2 cyprès issus de pollinisation contrôlée (total 60)

2 cyprès type *sempervirens* (Cs-H ou Cs-D) issus de pollinisation libre (total 80)

1 ou 2 cyprès *sempervirens* témoin (Cs) (total 60)

B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	dispo	B									
B	dispo	B									
B	dispo	B									
B	dispo	B									
B	dispo	B									
B	dispo	B									
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figure 24. Plan schématique du dispositif expérimental établi à partir de plantules de cyprès obtenues lors du semis de l'année 2005. Chaque caisse contenait 8 plants dont 2 de bordure (excepté les bouts de lignes).

2.4.2.2 Caractères observés

Pour la croissance, le dispositif a été suivi presque chaque mois et jusqu'en janvier 2007, en notant les mesures de hauteur et de diamètre de chaque cyprès ainsi que sa survie. Le nombre de noeuds et la phyllotaxie ont été observés au moins 3 fois (janvier 2006, aout 2006 et janvier 2007). Janvier correspond à la période de cessation de la croissance primaire. Une étiquette a été disposée sur l'axe mesuré afin de localiser la limite entre les pousses annuelles 2005 et 2006 et pour faciliter le suivi des notations.

Nous avons mesuré la hauteur totale des cyprès de l'insertion des cotylédons jusqu'à l'apex en utilisant une règle ou un mètre enrouleur avec une précision de 0.5 cm. Le diamètre du tronc ou axe principal (A1) a été mesuré au niveau de l'insertion des cotylédons avec l'aide d'un pied à coulisse à précision de 1 mm. L'axe principal a été décrit, selon est indiqué par Guédon *et al.* (2001), comme une séquence d'événements où le rang du nœud constitue le paramètre d'indes et où la phyllotaxie (verticillée par 2, 3 ou 4) et le nombre de branches correspondent aux variables mesurées.

2.4.2.3 Méthodes d'analyse

La croissance

La croissance en hauteur a été analysée avec le logiciel R par analyse de variance à deux facteurs : caisse et génotype ou groupe (Cd, Cd-Ex, Cs-H, Cs-D et Cs). Afin de normaliser les résidus, l'analyse a été effectuée sur la racine carrée de la variable hauteur :

$$Ht^{1/2} = \text{Caisse} + \text{Génotype (groupe)} + \text{Erreur}$$

Les accroissements moyens (en 2005 et en 2006) et leurs intervalles de confiance à 95 % ont été estimés pour les différents groupes.

Des tests de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) ont été réalisés pour la fréquence de nombre de noeuds observés en 2005 et 2005 / 2006. Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney est un test non paramétrique d'identité portant sur deux échantillons indépendants issus de variables numériques ou ordinales. Ces deux échantillons peuvent contenir des nombres différents d'observations, ou même faire référence à deux variables différentes. Il porte sur le fait que deux séries de valeurs numériques (ou ordinales) sont issues d'une même distribution. Étant un test non paramétrique, il ne fait aucune hypothèse sur les formes analytiques des distributions $F_1(x)$ et $F_2(x)$ des populations 1 et 2, il teste donc l'hypothèse :

H_0 : " $F_1 = F_2$ ". Il utilise non pas les valeurs prises par les observations, mais leur rang une fois ces observations réunies dans un même ensemble.

La phyllotaxie

L'analyse de la phyllotaxie a été faite avec le logiciel AMAPmod (Godin *et al.* 1997) et du point de vue « intensité » comme décrit par Guédon *et al.* (2001), qui permet d'étudier la variation des probabilités d'observation d'un événement donné et de caractériser la dynamique de la séquence. Ces probabilités sont présentées sous forme de courbe d'évolution de la phyllotaxie en fonction du rang des nœuds à partir de la base des arbres.

2.4.3 Résultats

2.4.3.1 La survie

Lors de l'établissement du dispositif et des premières mesures, 11 plantules ont présenté un dépérissement, puis sont mortes. Elles ont été remplacées par un regarni de cyprès *C. dupreziana* issues des graines récoltées sur des cyprès du Tassili *ex-situ* et avaient une

morphologie de cyprès vert (type Cs-H ou Cs-D). Nous avons travaillé alors sur 229 cyprès qui ont été divisés en 5 groupes en fonction de leur phénotype et niveau de ploïdie (Tableau 10).

Tableau 10. Cyprès sélectionnés dans le dispositif expérimental pour l'analyse de la croissance et phyllotaxie, groupés par leur phénotype et niveau de ploïdie.

Groupe	Origine des graines	Effectifs analysés
<i>Cupressus dupreziana</i> témoins (Cd)	Issues des cyprès du Tassili en Algérie (<i>in-situ</i>)	20
<i>Cupressus dupreziana</i> (Cd-Ex)	Issues de la pollinisation libre, autopollinisation et pollinisation contrôlée d'arbres <i>C. dupreziana</i> en collections en France (<i>ex-situ</i>)	67
<i>Cupressus sempervirens</i> témoins (Cs)	Issues de la pollinisation libre d'arbres en collection de l'INRA	60
<i>Cupressus sempervirens</i> diploïdes (Cs-D)	Issues de la pollinisation libre ou contrôlée avec du pollen de <i>C. sempervirens</i> d'arbres <i>C. dupreziana</i> en collection en France (<i>ex-situ</i>)	25
<i>Cupressus sempervirens</i> haploïdes (Cs-H)	Issues de la pollinisation libre et contrôlée d'arbres <i>C. dupreziana</i> en collections en France (<i>ex-situ</i>)	57

Après la première année d'installation du dispositif expérimental, quelques cyprès dépérissants ou couverts d'escargots ont fini par mourir entre fin août et décembre 2006 (Tableau 11). Toutefois ils ont été inclus dans les résultats.

Tableau 11. Nombre de cyprès, par groupe, morts pendant la dernière moitié de 2006 (deuxième année de croissance).

Groupe	Mortalité
<i>Cupressus dupreziana</i> témoins (Cd)	-
<i>Cupressus dupreziana</i> (Cd-Ex)	4 (2 fin Aout 2006 et 2 fin 2006)
<i>Cupressus sempervirens</i> témoins (Cs)	2 fin 2006
<i>Cupressus sempervirens</i> diploïdes (Cs-D)	7 fin 2006
<i>Cupressus sempervirens</i> haploïdes (Cs-H)	3 fin 2006

2.4.3.2 La croissance

Tous types génétiques confondus, la croissance a été beaucoup plus importante en seconde année (78 cm) qu'en première (9 cm). Toutefois, le classement relatif de ces 5 types

s'établit dès la première année (année de semis) et est conservé à la fin de la seconde (Figure 25).

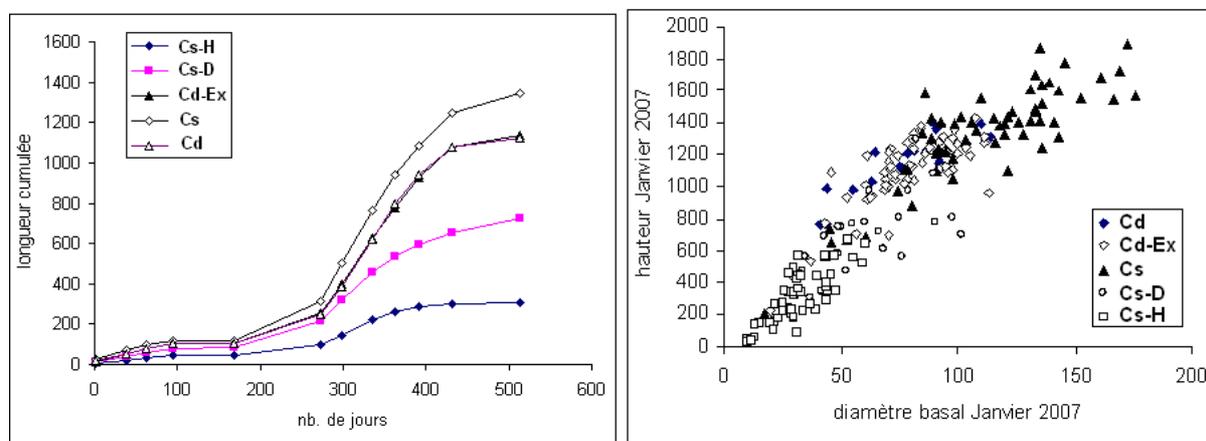


Figure 25. Dynamique d'allongement du tronc (à gauche). Le jour 0 correspond à l'installation du dispositif (fin août 2005). Le dernier jour du suivi correspond au 12 janvier 2007. Relation entre la hauteur et le diamètre basal (à droite) des cyprès âgés d'un an et sept mois. *Cupressus dupreziana* témoins (Cd), *Cupressus dupreziana* (Cd-Ex), *Cupressus sempervirens* témoins (Cs), *Cupressus sempervirens* diploïdes (Cs-D), *Cupressus sempervirens* haploïdes (Cs-H).

L'analyse de variance met en évidence des différences significatives entre les groupes génétiques mais pas entre caisses (Tableau 12)

Tableau 12. Analyse de variance de l'accroissement en hauteur des semis de cyprès lors des 2 premières années de croissance (2005 et 2006).

	Facteur	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F	Pr(F)
hauteur 2005	caisse	41	254.89	6.22	1.12	0.30
	groupe	4	548.43	137.11	24.7	2.5 e-16
	résidus	180	998.36	5.55		
hauteur 2006 (- 2005)	caisse	41	694.2	16.9	0.93	0.59
	groupe	4	9843.3	2460.8	135.22	<2e-16
	résidus	174	3166.5	18.2		

Les estimations des accroissements moyens montrent que la supériorité des cyprès verts témoins (Cs) par rapport au cyprès du Tassili n'est pas suffisante pour être significative en 2005 (Figure 26). Il est très intéressant de noter que les cyprès du Tassili provenant de graines récoltées en France (Cd-Ex) ont exactement la même croissance que les cyprès du Tassili provenant de graines récoltées dans l'aire naturelle de l'espèce (Cd). Les cyprès verts haploïdes (Cs-H) expriment une très faible croissance et les cyprès verts diploïdes (Cs-D) ont une vigueur intermédiaire. Ces deux groupes sont très inférieurs aux témoins, qu'ils soient *sempervirens* ou *dupreziana*.

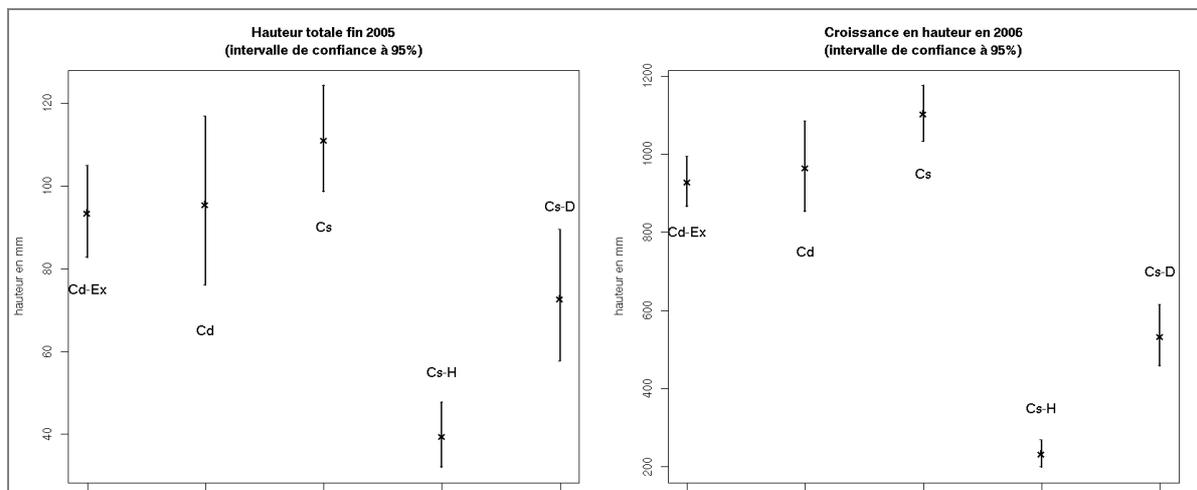


Figure 26. Estimations des accroissements moyens en hauteur par groupe de cyprès : *Cupressus dupreziana* témoins (Cd), *Cupressus dupreziana* (Cd-Ex), *Cupressus sempervirens* témoins (Cs), *Cupressus sempervirens* diploïdes (Cs-D), *Cupressus sempervirens* haploïdes (Cs-H).

L'analyse du nombre et de la longueur des entre-nœuds (Tableau 13) montre que les cyprès verts témoins (Cs) présentent plus d'entre-nœuds que les cyprès du Tassili (Cd et Cd-Ex), mais leur longueur ne sont pas différentes. Tandis que le comportement des cyprès de Tassili (Cd et Cd-Ex) est identique. D'autre part, la variabilité du nombre d'entre-nœuds est beaucoup plus faible que la variabilité de leurs longueurs. Par rapport aux témoins la réduction de la longueur d'entre-nœuds est d'environ 1/3 chez les cyprès verts diploïdes (Cs-D), et de 2/3 chez les cyprès verts haploïdes (Cs-H). Le fait que la longueur des entre-nœuds soit très courte surtout chez les cyprès verts haploïdes (Cs-H) est donc la principale raison de la faible taille de ce matériel.

Tableau 13. Moyenne (écart-type) du nombre de noeuds et de leur longueur à la fin de 2005 et 2006.

Groupe	Nombre de cyprès	Nombre d'entre-noeuds		Longueur moyenne des entre-noeuds	
		Fin 2005	Fin 2006	Fin 2005	Fin 2006
<i>Cupressus dupreziana</i> témoins (Cd)	20	26.25 (5.17) a	90.80 (7.39) a	3.40 (1.60) a	15.30 (2.55) a
<i>Cupressus dupreziana</i> (Cd-Ex)	67	27.61 (5.25) a	88.30 (10.99) a	3.17 (1.36) a	15.65 (2.69) a
<i>Cupressus sempervirens</i> témoins (Cs)	60	34.04 (5.83) b	107.03 (15.23) b	3.20 (1.32) a	14.86 (3.56) a
<i>Cupressus sempervirens</i> diploïdes (Cs-D)	25	26.84 (7.12) a	82.16 (18.84) c	2.50 (1.63) b	10.87 (3.79) b
<i>Cupressus sempervirens</i> haploïdes (Cs-H)	57	26.60 (6.43) a	71.31 (17.76) d	1.07 (0.67) c	5.21 (2.43) c

2.4.3.3 La phyllotaxie

Les courbes d'évolution de la phyllotaxie en fonction du rang du nœud porteur, pour chacun des groupes (Cd, Cd-Ex, Cs, Cs-D, Cs-H), sont présentées dans la Figure 27.

Un changement de phyllotaxie verticillée par 4, par 3 et enfin par 2 est généralement observé au cours des premières années de croissance des *Cupressus*. Chez les cyprès verts témoins (Cs), 50 % des arbres passent en phyllotaxie verticillée par 3 vers le 50^{ème} nœud. Chez les cyprès verts diploïdes (Cs-D), 50 % des arbres passent en phyllotaxie verticillée par 3 au niveau du 6^{ème} nœud. Chez les cyprès verts haploïdes (Cs-H), 50 % des arbres passent en phyllotaxie 3 au niveau du 4^{ème} nœud et 20 % des arbres passent en phyllotaxie verticillée par 2 au niveau du 8^{ème} nœud. Chez les cyprès du Tassili témoins (Cd), seulement 10 % des arbres passent en phyllotaxie verticillée par 3. Chez les cyprès du Tassili originaires des collections françaises (Cd-Ex), 20 % des arbres passent en phyllotaxie 3 au niveau du 10^{ème} nœud.

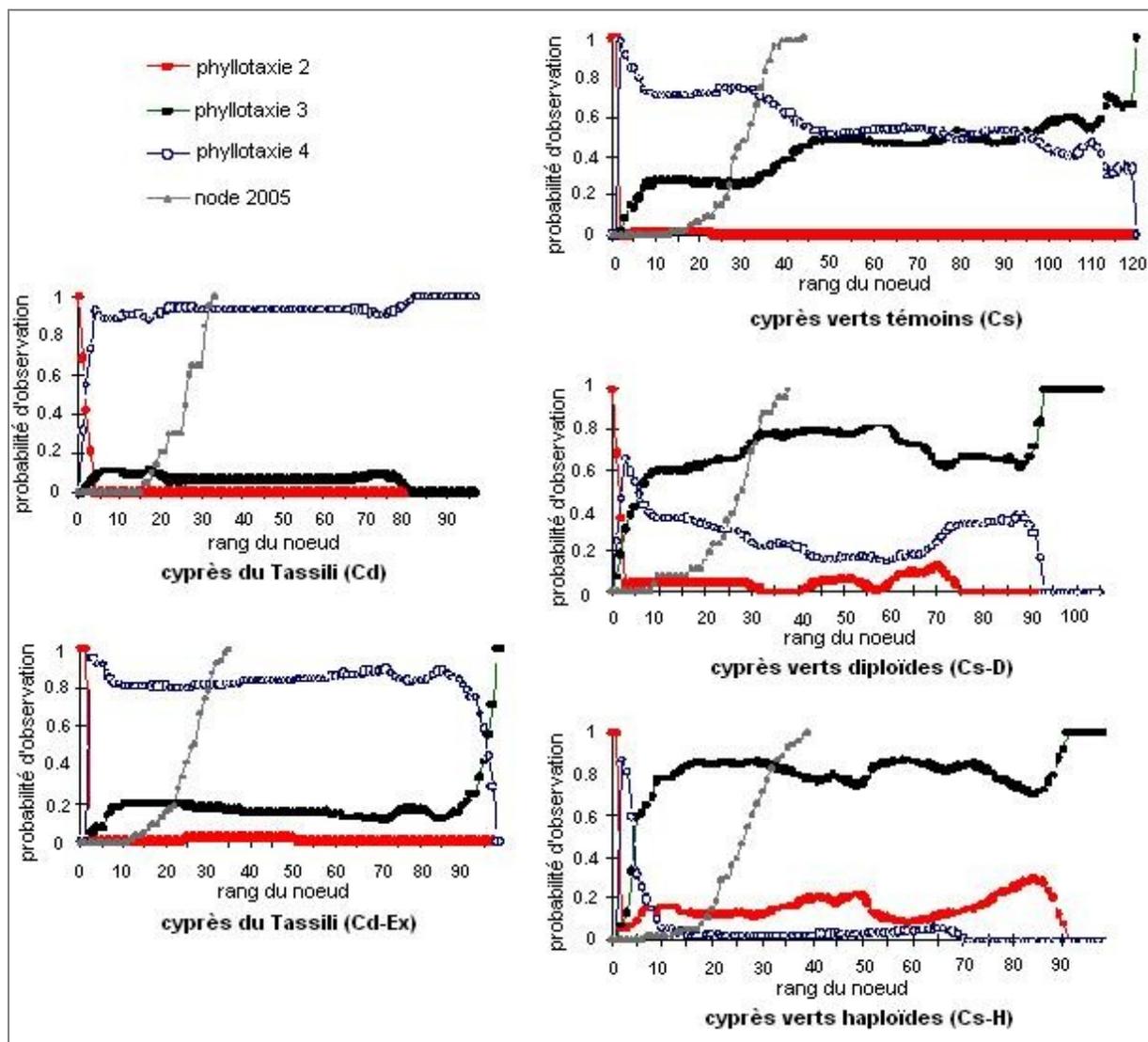


Figure 27. Probabilités d'observation du nombre de feuilles (phyllotaxie), pour chaque groupe génétique, en fonction du rang du nœud à partir des cotylédons le long du tronc pendant l'année et sept mois de croissance. Les courbes colorées correspondent aux différentes phyllotaxies. Les courbes grises correspondent aux fonctions cumulatives du nombre de nœuds constituant l'axe des arbres au moment des arrêts de croissance interannuels (fin 2005).

2.4.4 Conclusion

L'ensemble de caractéristiques observées sur la croissance (hauteur, diamètre, nombre d'entre-nœuds et longueur moyenne des entre-nœuds) ainsi que la phyllotaxie, ont permis de distinguer le comportement de chaque groupe de cyprès (Cd, Cd-Ex, Cs, Cs-D, Cs-H).

Selon nos résultats, le groupe des cyprès verts haploïdes (Cs-H) obtenus à partir de graines issues de la pollinisation libre et contrôlée d'arbres *C. dupreziana* en collections en France (*ex-situ*), se caractérisent par un allongement faible, des entre-nœuds très courts et un passage plus rapide de la phyllotaxie verticillée par 4 à celle verticillée par 3 et par 2. D'autre part, ce comportement mais moins prononcé se retrouve chez les cyprès verts diploïdes (Cs-D) obtenus à partir de graines issues de pollinisation libre ou contrôlée, avec du pollen de *C. sempervirens*, d'arbres *C. dupreziana* en collection en France (*ex-situ*). Enfin, le comportement des groupes des cyprès de Tassili (Cd et Cd-Ex) est similaire et proche à celui des cyprès verts témoins (Cs).

Diverses études comparatives basées sur la croissance et les caractères morphologiques entre plantes haploïdes et diploïdes ou de ploïdie différente, ont été réalisées chez le cacaoyer, le caféier, le pommier et le peuplier. Dublin (1973) a comparé des plantules haploïdes et diploïdes de *Theobroma cacao*. Les plantules haploïdes ont été caractérisées par une croissance très lente, avec des feuilles petites, étroites, de contour irrégulier et à limbe gaufré. Dublin et Parvais (1975, 1976) ont trouvé : d'une part, 3 plantules haploïdes (sur vingt mille) de *Coffea canephora* issues de graines monoembryonnées, de taille petite et à entre-nœuds plus courts que ceux de plantes diploïdes, avec des feuilles étroites, légèrement gaufrées et de couleur vert pâle ; d'autre part, 19 plantules haploïdes (sur deux mille) de *Coffea arabica* issues de polyembryons, présentaient des tiges plus grêles à entre-nœuds courts, des ramifications plagiotropes précoce et feuilles vert pâle. Lespinasse et Noiton (1986) ont comparé une plante de *Malus pumila* Mill. avec des clones de ploïdie différente, et ils ont trouvé que la plante haploïde avait les entre-nœuds plus courts et les feuilles de forme très allongée. Kiss *et al.* (2001) ont trouvé 8 plantes haploïdes (sur deux cent huit) de *Populus nigra* avec un développement retardé, une taille et une forme des feuilles différentes et plus ramifiés que les plantes diploïdes et tétraploïdes. Néanmoins, ils signalent que plusieurs plantes diploïdes montraient le même comportement que les plantes haploïdes.

Nos résultats et ceux de travaux mentionnés sont d'accord en ce qui concerne la taille réduite et les entre-nœuds courts chez les haploïdes. D'autre part et dans notre cas, la différence entre le comportement des cyprès verts diploïdes (Cs-D) et les témoins (Cs), lequel est très proche à celui des cyprès verts haploïdes (Cs-H), est probablement due à l'expression de gènes à l'état homozygote de la plupart des individus de ce groupe, état vérifié avec des marqueurs codominants microsatellites (voir souschapitre 2.3).

2.5 Production de cônes mâles et microsporogenèse chez les cyprès *C. sempervirens* issus de « mères » *C. dupreziana*

Les études cyto-histologiques présentées dans ce souschapitre ont été effectuées en collaboration avec Mohamed El Maâtaoui de l'Université d'Avignon. En effet, nous nous sommes intéressés à la production de structures reproductrices mâles et leur viabilité chez les cyprès *C. sempervirens* obtenus à partir de graines issues de la pollinisation libre d'arbres *C. dupreziana*, et semées en 2000 et 2001. Considérant que l'espèce *C. sempervirens* est intensivement répandue dans la région Méditerranéenne soit en plantation, soit en brise-vent ou en ornement ; l'objectif principal de cette étude était d'évaluer les anomalies de reproduction à l'origine d'une faible production de pollen, afin de développer postérieurement des lignées stériles qui puissent substituer les plantations actuelles de cyprès vert pour contribuer à la diminution des allergies.

2.5.1 Viabilité des cônes mâles et microsporogenèse chez deux cyprès *C. sempervirens* : l'un haploïde et l'autre homozygote

La collection de cyprès haploïdes a été suivie pendant deux ans, les hivers 2005-2006 et 2006-2007, en observant surtout la production de structures reproductrices mâles. On a choisi deux cyprès *C. sempervirens* : l'un haploïde et l'autre diploïde homozygote, obtenus à partir du semis de l'année 2000 ; et présentant une production de structures reproductrices mâles à l'automne 2005 - 2006. La viabilité des cônes mâles ainsi que la microsporogenèse ont été étudiées. Les principaux résultats de cette étude sont présentés dans la publication suivante, soumis à la revue Sexual Plant Reproduction.

Rivera Nava, J. L. ; C. Pichot ; M. El Maâtaoui. Microsporogenesis and pollen development in haploid and homozygous *Cupressus sempervirens* genotypes produced by *C. dupreziana* seed trees.

Microsporogenesis and pollen development in haploid and homozygous *Cupressus sempervirens* genotypes produced by *C. dupreziana* seed trees

Juana Laura Rivera Nava¹, Christian Pichot¹, Mohamed El Maâtaoui^{2*}

1 Unité de Recherches Forestières Méditerranéennes (UR 629), Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France

2 Unité Mixte de Recherche A 406 Ecologie des Invertébrés INRA/Université d'Avignon, 33 rue L. Pasteur, 84000 Avignon, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: mohamed.elmaataoui@univavignon.fr

Summary

We assessed the pollen production abilities of a haploid and a homozygous *Cupressus sempervirens* L. tree chosen among a paternal apomixis-derived progeny produced by *C. dupreziana* surrogate mother. Data from morphological and cytohistological observations showed that the haploid genotype initiates meiosis but the majority of the resulted microspores do not successfully form pollen, probably because the haploid chromosome complement is irregularly segregated. The male cones aborted without pollen shedding. Unexpectedly, in the homozygous genotype microspore mother cells did not undertake meiosis. The male development showed an early arrest at the stage of sporogenous tissue before abortion and cones fall. These results suggest that sterile or low pollen-forming lines of the Mediterranean cypress (*C. sempervirens* L.) may constitute an elegant solution to reduce its impact on air-born, winter pollen allergy.

Keywords

Cupressus sempervirens ·haploid ·homozygous ·aberrant microsporogenesis ·pollen abortion

Introduction

In seed plants (Spermatophytes) the sexual reproductive cycle involves the alternation of diploid (sporophytes) and haploid (gametophytes) organisms delimited by meiosis and fertilization (mixis or fusion of male and female gametes). Fertilization results in the production of a diploid zygote that generates a seed embryo (the new sporophyte) with a biparental nuclear genome. However, some flowering plants (Angiosperms) are able to perform an apomictic reproductive program in which fertilization is omitted and a cell from the female reproductive organ undergoes embryogenesis. Thus, in this case the produced seeds give rise to progeny with a maternally inherited genotype (Vielle Calzada et al. 1996; Grimanelli et al. 2001). Since recently, apomixis was only described in the Angiosperm group

of Spermatophytes (reviewed in: Koltunow, 1993; Bicknell and Koltunow, 2004). However, studying the reproductive biology of Mediterranean *Cupressus* species we discovered that in controlled crosses *C. sempervirens* L. X *C. dupreziana* A. Camus the seed-derived progenies strictly exhibited paternal characters (Pichot et al. 2001). This finding points to an apomictic development of seed embryos from male reproductive structures i.e. microgametophytes after pollination. The female structures merely support the development of the male embryos by supplying nutriment, thus behaving as surrogate mothers. Herein referred to as paternal apomixis, this reproductive process suggests that the microgametophyte is endowed with *in ovulo* autonomous embryogenic abilities (androgenesis) and the nourishing tissue, the megagametophyte, develops concomitantly to provide nutritive substances. To evaluate the prevalence and the importance of this phenomenon we recently analysed progeny produced by seeds collected from open-pollinated *C. dupreziana* trees planted in *ex-situ* collections (Pichot et al. *in press*). Interestingly, the results confirmed that (1) Mediterranean cypresses are prone to paternal apomixis, and (2) provide evidence for the production of all paternal haploid and diploid *C. sempervirens* seedlings *via* this process. Using nuclear microsatellites markers we showed that the diploid seedlings were homozygous (Rivera et al. 2007), presumably by spontaneous dihaploidisation. Haploid and homozygous cypress genotypes are of *main* interest in breeding programs of the genus *Cupressus*. The present study is a part of a research program devoted to the production of sterile ornamental genotypes of *C. sempervirens*. These genotypes would present the double advantage of a disrupted or nullified production of female and male cones. High female cone production actually alters the crown shape of *C. sempervirens* cultivars and cypress pollen is responsible for a harmful pollen allergy that is a major problem of health in the Mediterranean region where the species is massively planted (Charpin et al. 2005). The production of sterile or low pollen-forming clones in *C. sempervirens* may reduce the airborne concentration of cypress pollen. Genotypes with aberrant pollen production may be obtained through screening for meiotic defects in the haploid and homozygous progenies. In this context we studied here, by cytological approaches, the development of male reproductive structures from microsporogenesis to pollen differentiation of two *C. sempervirens* trees: one haploid and one diploid homozygous. In both genotypes it appeared that pollen production is abnormal or suppressed due to meiotic defects or absence of meiosis.

Materials and methods

Open-pollinated cones from *C. dupreziana* trees planted in *ex-situ* cypress collections in France were harvested in 1999 and 2000. The extracted seeds were sown and the seedlings were transplanted in 5 litres containers and maintained under green house conditions. The obtained population was composed of two phenotypes: *C. dupreziana* phenotype and *C. sempervirens* phenotype (Pichot et al. *in press*). From this latter sub-population of five old seedlings we selected a haploid and a homozygous individuals that initiated male cones. A wild *C. sempervirens* was used as control.

Developing male cones were collected weekly from December 2005 to February 2006 from the individuals under study and subjected to morphological and cytological studies. Samples were fixed in formalin-acetic acid-alcohol (FAA: 5:5:90, by volume). To improve fixation, cones were sliced longitudinally prior to immersion in the fixative and subjected to vacuum during 20 minutes. The material was rinsed overnight in tap water, dehydrated in an ethanol series (70%-100%), and carefully dissected to isolate the microsporangia-bearing scales (microsporophylls). The samples were then embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate resin. After resin polymerization at room temperature, the blocks were sectioned at 3 μm thickness using an automatic retracting microtome (Supercut 2065; Reichert-Jung, Leica Instruments, Nussloch, Germany) equipped with disposable knives (Histoknife H; Heraeus-Kulzer). The sections were stained using periodic acid-Schiff's reagent (PAS) in combination with naphthol blue black to reveal insoluble polysaccharides and proteins, respectively (see El Maâtaoui and Pichot, 2001 for details). About 15-20 microsporangia were examined from each collection date. To observe the general morphology and nuclear structures of microspores and pollen, the classical squash method in acetocarmine or in the DNA-specific fluorochrome DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole; high-resolution DNA kit; Partec, Münster, Germany) were used. In the last case, observations were made under a fluorescence microscope to visualize nuclei.

Results

Macroscopic observations showed that in general and independently of the developmental stages the size of male cones from the haploid cypress was highly reduced compared to that of the cones of both homozygous and control cypresses (Fig. 1a-c).

Microsporogenesis and pollen development in the control *C. sempervirens* tree

As reported for *Cupressus dupreziana* (El Maâtaoui and Pichot, 2001), the male cones of *C. sempervirens* are composed of 4-5 decussate pairs of scales bearing microsporangia.

All the samples collected during December showed microsporangia in pre-meiosis. Microscopic observations revealed that at this stage a great part of their volume consisted in a massive sporogenous tissue surrounded by tapetal layers and the epidermis (Fig. 2a). The sporogenous cells exhibited characteristic cytological traits such as a dense cytoplasm and a prominent nucleus suggesting an active metabolism. The meiotic process began asynchronously in late January and was generally preceded by starch accumulation (Fig. 2b). During early February the microspore mother cells (MMC) separated from each other (Fig. 2c) before chromosome condensation and segregation leading to dyads (Fig. 2d) and tetrads (Fig. 2e). After release from tetrads (Fig. 2f), the microspores increased in size, accumulated starch and progressed towards pollen differentiation. Sections of microsporangia excised from male cones just before pollen shedding (Fig. 2g) exhibited uniformly sized pollen grains (Fig. 2h) with a thick wall composed of exine and intine layers and a condensed cytoplasm with

prominent starch granules. Full pollen maturation and shedding took place during last February-early March.

Microsporogenesis and pollen development in the haploid *C. sempervirens* tree

The premeiotic development in the haploid tree was apparently similar to that described above for control. Both the sporogenous cells and the encompassing tissues exhibited normal cytological features (Fig. 3a). However, meiosis, microsporogenesis and pollen differentiation proved to be abnormal. Despite the great number of examined microsporangia, no typical first and second meiotic divisions were observed. Instead, we noted aberrant chromosome segregations and cytokinesis resulting in the formation of heterogeneously nucleated microspores (Fig. 3c-f). Binucleate, trinucleate, and tetranucleate microspores were among the more frequent meiotic end products. Nucleated (cytoplasts) microspores were also observed (not shown).

However, their subsequent development toward pollen grains proved to be highly disrupted. Indeed, sections from microsporangia collected during February revealed cytological features indicating microspore and pollen degeneration. This included failure in pollen wall formation, nuclear pycnosis due to chromatin condensation, and starch accumulation (Fig. 3g). A majority of microsporangia collected in early February displayed numerous collapsing cells as attested by the presence of free starch grains and chromatin treads that form gelatinous masses filling the locules (Fig. 3h). In sections of some microsporangia collected in late February we noted the presence of scarcely distributed, apparently normal pollen grains exhibiting thickened intine, voluminous starch grains and highly condensed chromatin (Fig. 3i).

Subsequent development of male cones was characterised by progressive browning of scales and microsporangia and the absence of pollen release (dehiscence) (Fig. 3j). Microscopic inspection of squash preparations from these kinds of samples (last collections) revealed a few heterogeneous pollen grains differing in shape, size and in their nuclear apparatus (Fig. 3k-o). They were embedded in remains of organelles from degenerated cells.

Microsporogenesis in the diploid homozygous *C. sempervirens* tree

In spite of normal morphologic appearance of the cones, the process of male development in the homozygous tree was surprisingly characterised by the absence of any meiotic event and pollen formation. Indeed, sections of microsporangia from all collection dates invariably displayed sporogenous tissues arrested in premeiotic-like stages (Fig. 4a,b). The surrounding tissues i.e. tapetum, middle layer, and epidermis exhibited normal cytological traits (Fig. 4b). Here we also noted that as the development proceeded, the male cones browned (Fig. 4c) and finally necrosed (Fig. 4d).

Discussion

The main objective of this study was to assess the possibility to interfere with pollen production in *C. sempervirens*. This species, as well as *C. arizonica*, has been intensively used in Mediterranean urban areas as ornamental tree or hedges. New plantations are probably one of main factors that could explain the increase of pollen allergy due to cypresses during the last decades (Hidalgo et al. 2003; Charpin et al. 2005). One of the proposed solutions to overcome this problem is to select genotypes with low pollen production. Our results suggest that the haploid and diploid homozygous progeny derived from *in planta* androgenesis via *C. dupreziana* as surrogate mother may constitute a very good material for the selection of such lines. Cytological study revealed important and changes in the male reproductive development in both the haploid and the diploid homozygous individuals examined.

In contrast to the control *C. sempervirens* tree in which the whole course of microsporogenesis and pollen formation was typical of diploid conifers (Pennel, 1988), the haploid tree exhibited altered male development leading to pollen abortion. Despite the fact that the microspore mother cells apparently prepare for, and embark upon meiosis, the meiotic process did not result in the formation of functional microspores. The majority of the meiotic products showed nuclear irregularities that affect microspore abilities to differentiate into pollen grains. The occurrence of pollen with normal gross morphology has been only sporadically observed in our investigation but this pollen remained unshed.

The end products of male haploid meiosis have been well studied in angiosperms in which haploid lines can be obtained by *in vitro* culture of developing anthers at microspore stage (Reviewed in Palmer and Keller, 1997). In many species it has been shown that microspore degeneration and pollen abortion are the rule. Based on cytogenetic approaches, this has been attributed to the lack of chromosome pairing due to the haploid state of the microspore mother cells and, consequently, lead to irregular chromosome partitioning (Sulistyaningsih et al. 1997; Diettrich et al. 2000; Li Ying et al. 2000; Kaneco et al. 2003). In conifers, *Thuja plicata gracilis* is the only species in which the courses of haploid male meiosis and pollen differentiation have been reported (Simak et al. 1974). Arrest of meiosis, disturbance of microsporogenesis and haphazard chromosome partitioning leading to pollen failure has been observed. Our results suggest that it is likely that similar mechanisms are involved in our haploid cypress. Wilson and Owens (2003) also observed profound breakdown of the male development in a sterile *Pinus monticola* individual that interfere with the differentiation of microspores and pollen. In this last case however, the ploidy level of the investigated tree was not specified.

Cytological analysis of the male reproductive development in our diploid homozygous tree revealed an arrest at early sporogenous tissue resulting in total sterility. This result is rather surprising since a normal meiosis was expected in this diploid individual. Our observations suggest that abnormalities occur at the very beginning of meiosis initiation, before chromosome pairing, and consequently would not be related to ploidy level. Moreover, we can hypothesize that the homozygous state would be responsible for the expression of one

or several recessive deleterious alleles for a gene involved in the first step of the meiotic process. Genes that control the initiation of meiosis have been reported in maize (Golubovskaya et al. 1993; Li et al. 2007) and in *Arabidopsis* (Li et al. 2004). A high number of recessive deleterious or lethal alleles is a general feature observed in out crossing species (Charlesworth and Charlesworth 1987). Although the expressed genetic load of allogamous species is not different from that of autogamous species when sexual reproduction is normal (respectively allogamy or autogamy), the number of deleterious mutations is far greater in allogamous species. Most of deleterious mutations are masked by dominant alleles in heterozygous genotypes and are completely revealed in diploid homozygous genotypes such as the cypress individual examined here. The deleterious effect of mutant genes would be also responsible for inbreeding depression that we observed for growth and survival in the diploid homozygous progeny (Pichot et al. *in press*).

Since decades, several research programs were devoted to the production of haploids. In Angiosperms, haploid production from gynogenesis or androgenesis is largely used. The first haploid gymnosperms were reported by Illies in 1964 and Pohlheim in 1968 (*in*: Simak et al. 1968) and were hypothesized to arise in unfertilized archegonia stimulated by fertilized ones. More recently, embryogenic haploid tissues were initiated *in vitro* from *Larix decidua* Mill. megagametophytes (von Aderkas et al. 2003) and some rare plants were regenerated (von Aderkas and Bonga 1993). Conifer androgenesis was also experimented for various species belonging to different genus: *Pinus*, *Picea*, *Larix* and embryoids were recently obtained from *L. sibirica* Ledeb. microsporophyll cultures (Tretyakova et al. 2006). The efficient production of haploid or diploid homozygous *C. sempervirens* from *C. dupreziana* seed trees makes it possible, for the first time in gymnosperms, to develop haplo-diploid strategies. This material is not only well suited for the selection for sterile cultivars but also constitutes a unique experimental system for the study of gene expression.

References

- Bicknell RA, Koltunow AM (2004) Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. *Plant cell* 16: S228-S245
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 237-268
- Charpin D, Calleja M, Pichot C, Waisel Y (2005) Allergy to cypress pollen. *Allergy* 60: 293-301
- Diettrich B, Ernst S, Luckner L (2000) Haploid plants regenerated from androgenic cell cultures of *Digitalis lanata*. *Planta Med* 66: 237-240

- El Maâtaoui M, Pichot C (2001) Microsporogenesis in the endangered species *Cupressus dupreziana* A. Camus: evidence for meiotic defects yielding unreduced and abortive pollen. *Planta* 213: 543-549
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U (2001) Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends Genet* 17: 597-601
- Golubovskaya I, Grebennikova ZK, Avalkina NA, Sheridan WF (1993) The role of *ameiotic 1* gene in the initiation of meiosis and in subsequent meiotic events in maize. *Genetics* 135: 1151-1166
- Hidalgo PJ, Galan C, Dominguez E (2003) Male phenology of three species of *Cupressus*: correlation with airborne pollen. *Trees* 17: 336-344
- Kaneco Y, Bang SW, Torii-Abe J, Eduardo RB, Matsuzawa Y (2003) Chromosome pairing in haploid plants of radish derived from alien monosomic addition lines. *Plant Breeding* 122: 450-452
- Koltunow AM (1993) Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell* 5: 1425-1438
- Li W, Chen C, Markmann-Mulisch U, Timofejeva L, Schmelzer E, Ma H, Reiss B (2004) The *Arabidopsis* AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *PNAS* 101: 10596-10601
- Li J, Harper LC, Golubovskaya I, Wang CR, Weber D, Meeley RB, McElver J, Bowen B, Cande WZ Schnable PS (2007) Functional analysis of maize RDA51 in meiosis and doublestrand break repair. *Genetics* 176: 1469-1482
- Li-Ying Y, Zhang XZ, Liu GJ (2000) Occurrence of unreduced gametes and ploidy restoration in haploid *Capsicum annuum* L. *J Hort Sci Biotech* 75: 195-197
- Palmer CE, Keller WA (1997) Pollen embryos. *In*: Shivanna KR, Sawhney VK (eds) *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 392-422
- Pennell RI (1988) Sporogenesis in conifers. *Adv Bot Res* 15: 179-193
- Pichot C, El Maâtaoui M (2000) Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. *Theor Appl Genet* 101: 574-579
- Pichot C, Fady B, Hochu I (2000) Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryos. *Ann For Sci* 57: 17-22
- Pichot C, El Maâtaoui M, Raddi S, Raddi P (2001) Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* 412: 39
- Pichot C, Liens B, Rivera Nava JL, Bachelier JB, El Maâtaoui M (2008) Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen. *Genetics (in press)*

Rivera Nava JL, Pichot C, El Maâtaoui M (2007) Natural production of all paternal *Cupressus sempervirens* seedlings from *Cupressus dupreziana* surrogate mothers. 3rd International Apomixis Conference. Wernigerode, Germany, 27 June-01 July 2007, (Abstract)

Simak M, Gustafsson A, Ching K (1968) occurrence of a mosaic-aneuploid in polyembryonic Norway spruce seed. *Studia Forestalia Suecica* 67. Royal Coll. For., Stockholm 8 p

Simak M, Gustafsson A, Rautenberg W (1974) Meiosis and pollen formation in haploid *Thuja plicata gracilis* Oud. *Hereditas* 76: 227-238

Sulistyaningsih E, Tashiro Y, Shigyo M, Isshiki S (1997) Morphological and cytological characters of haploid shallot (*Allium cepa*, L. *Aggregatum* group). *Bull Fac Agri Saga Univ* 82: 7-15

Tretyakova I N, Vyazovetskova AS, Ivanova AN (2006) Induction of Androgenic Cultures of Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.). *Eurasian J For Res* 9: 37-44

Vielle Calzada JP, Crane CF, Stelly DM (1996) Apomixis. The asexual revolution. *Science* 274: 1322-1323

von Aderkas P, Pattanavibool R, Hristoforoglu K, Ma Y (2004) Embryogenesis and genetic stability in long term megagametophyte-derived cultures of larch. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 75:27-34

von Aderkas P, Bonga JM (1993). Plants from haploid tissue culture of *Larix decidua*. *Theor Appl Gen* 87:225-228

Wilson WR, Owens NW (2003) Histology of sterile male and female cones in *Pinus monticola* (western white pine). *Sex Plant Reprod* 15: 301-310

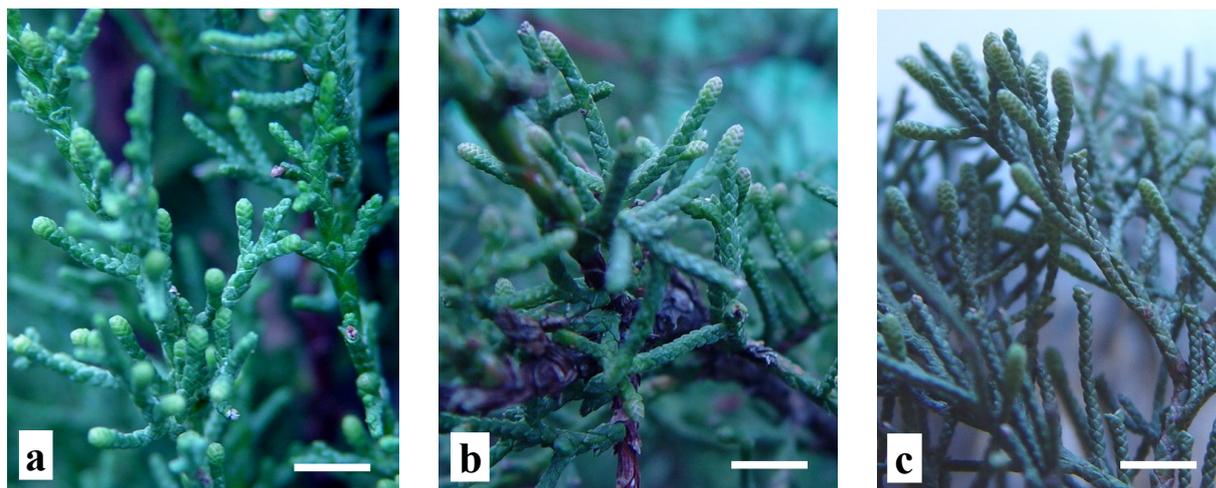


Fig. 1a-c General morphology of male cones. Note the reduced size of haploid cones (**a**) compared to that of diploid homozygous (**b**) and control (**c**). Bars **a** 8 mm; **b** 11 mm; **c** 13 mm.

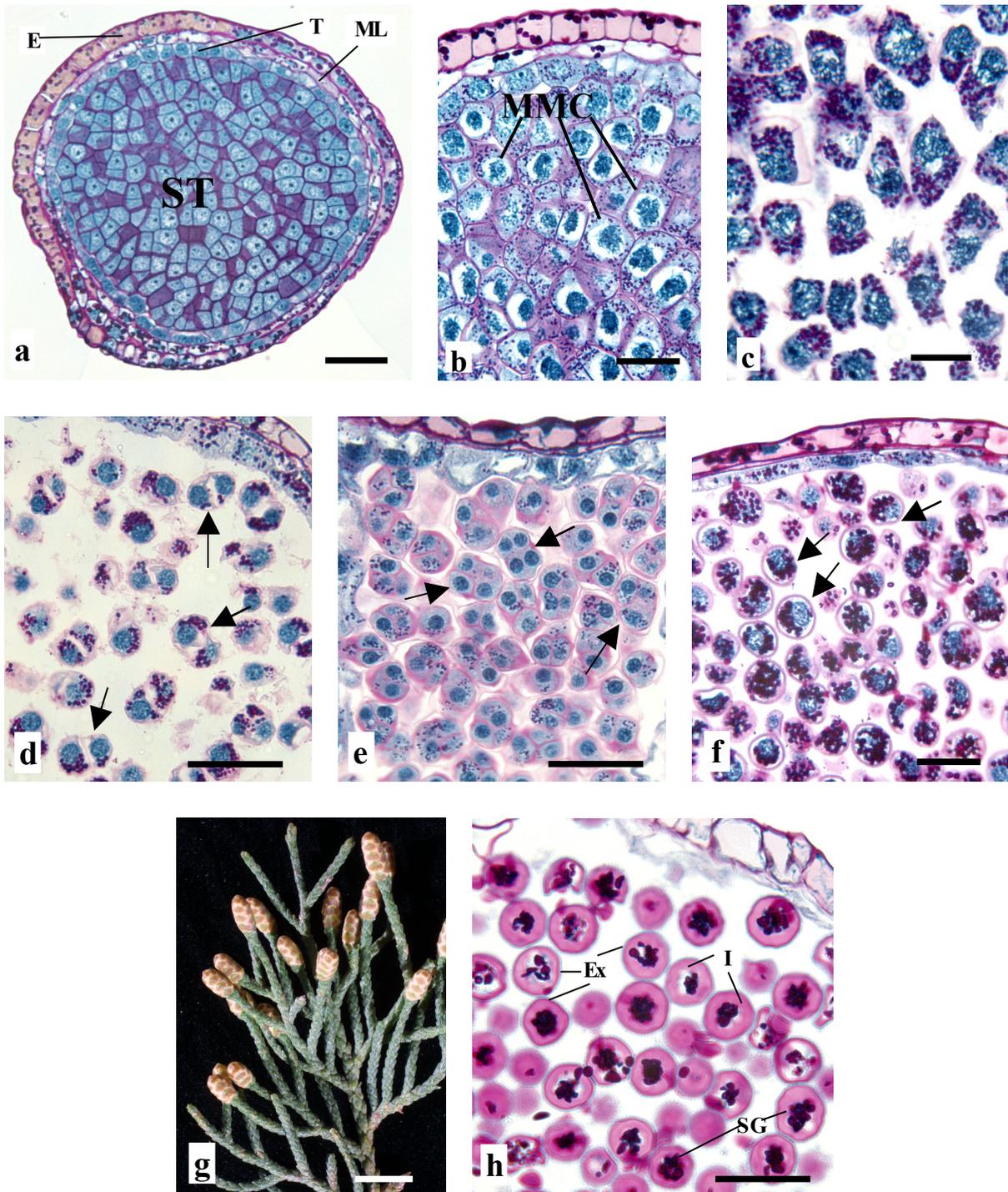


Fig. 2a-h Development of male reproductive structures in the control tree. **a** Transverse section of a premeiotic microsporangium showing the sporogenous tissue (ST) surrounded by tapetum (T), middle layer (ML), and epidermis (E). **b** Starch synthesis (red granules), and nuclear DNA condensation in the microspore mother cells (MMC) marked their entry in meiosis. MMCs isolated from each other (**c**) before dyad (**d**, arrows), tetrad (**e**, arrows), and individualized microspore (**f**, arrows) formation. Just before anthesis the male cones turned yellow (**g**). At this stage their content consisted of quasi-mature pollen grains (**h**) with exine (Ex), intine (I), and prominent starch grains (SG). Bars **a** 130 μ m; **b**, **f** 30 μ m; **c** 20 μ m; **d**, **e**, **h**, 42 μ m; **g** 1 cm.

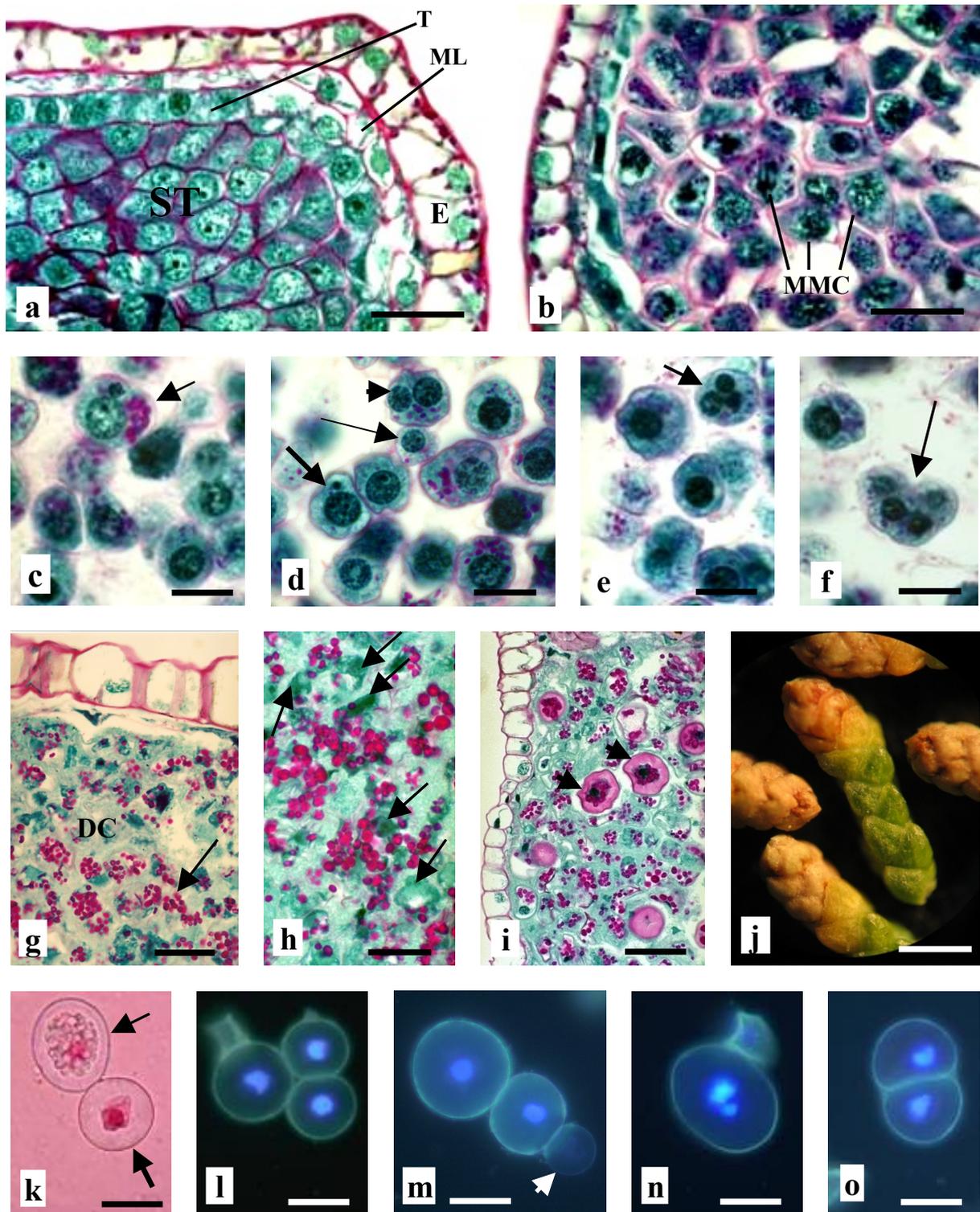


Fig. 3a-o Microsporogenesis and pollen differentiation in the haploid *C. sempervirens* tree. **a** Section of microsporangium in the pre-meiotic stage showing an apparently conform structure. ST = sporogenous tissue, T = tapetum, ML = middle layer, E = epidermis. **b** Section showing microspore mother cells (MMC) at the beginning of meiosis. **c-f** Sections from post meiotic microsporangia illustrating microspore heterogeneity. **c** Heteronucleated microspore with starch grains (arrow). **d** Section showing a microspore with a micronucleus (bold arrow), a binucleate microspore (arrowhead), and microspore with a reduced size (thin arrow). **e** Trinucleated microspore (arrow). **f** Tetranucleate microspore (arrow). **g-i** Pollen abortion. The majority of microspores collapsed (**g**) releasing their organelles in the locules of

microsporangia (arrow). DC = degenerated cells. **h** Gelatinous masses containing chromatin treads (arrows) and starch. **i** Microsporangium with scarce pollen grains exhibiting thickened intine (arrowheads), prominent starch grains and highly condensed chromatin. **j** Browning of male cones prior complete necrosis. **k-o** Mature pollen grains from squashed microsporangia. **k** One pollen grain with a nucleus (bold arrow) and one pollen grain with a nucleus and starch (thin arrow) (acetocarmine staining). **l-o** DAPI-stained pollen grains. **l** Attached pollen grains. **m** Three grains with different size; the smaller is an anucleate (cytoplast) (arrow). **n** Pollen grain with a micronucleus. **o** Twin pollen. Bars **a, b** 28 mm; **c, e** 13 mm; **d, f** 12 mm; **g** 25 mm; **h** 17 mm; **i** 40; **j** 2 mm; **k-o** 40 mm.

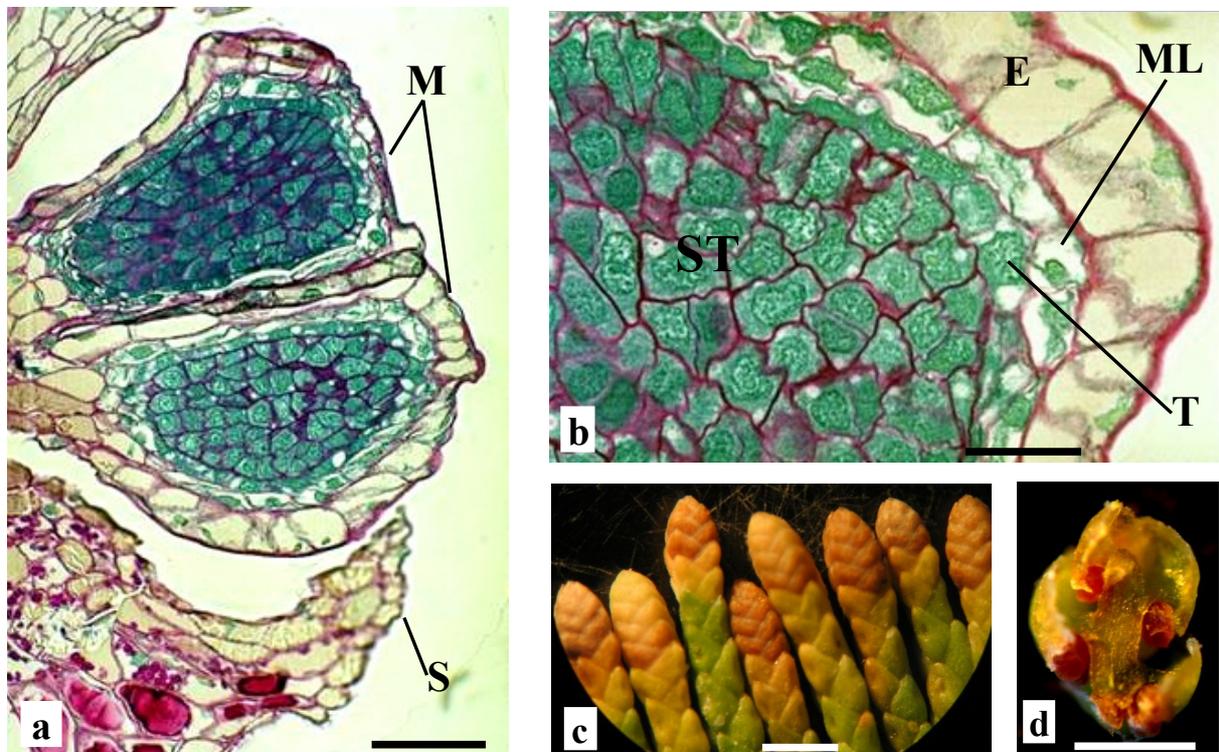


Fig. 4a-d Male development in the diploid homozygous *C. sempervirens* tree. **a** Section of premeiotic microsporangium showing conform structure. M = microsporangium, S = scale. **b** Section of a microsporangium just before male cone necrosis (last collection). Note the arrested development of microspore mother cells and the persistence of the tapetum and the middle layer. ST = sporogenous tissue, T = tapetum, ML = middle layer, E = epidermis. **c** Mature appearance of male cones. **d** Scales from a necrosed male cone showing degenerated microsporangia. Bars **a** 68 mm; **b** 25 mm; **c** 3 mm; **d** 1 mm.

2.5.2 Observations complémentaires

Le suivi des collections de cyprès haploïdes et homozygotes a permis de détecter les individus qui ont présenté une production de cônes mâles. En général, la taille et le comportement en termes de maturation de ces cônes ont été similaires aux profils des cyprès décrits dans l'article précédent. D'autre part, un cyprès homozygote a produit des cônes mâles plus gros que ceux des autres cyprès. L'analyse microscopique a montré que cet individu présentait aussi des anomalies au niveau de la microsporogénèse. A la fin de la période normale de maturation, ces cônes sont restés fermés finissant par tomber de l'arbre. Ce même cyprès homozygote a présenté quelques rameaux avec des cônes mâles et femelles produits de la même ramule (Figure 28).

2.5.3 Conclusion

Dans cette partie de la thèse, nous avons mis en évidence les anomalies méiotiques et les altérations des structures reproductrices présentées chez les cyprès *C. sempervirens* haploïdes et homozygotes issus d'apomixie paternelle sur l'espèce *C. dupreziana* comme « mère porteuse ». En effet, nos observations morphologiques et cytohistologiques montrent que les cyprès haploïdes peuvent initier la méiose sans arriver à une formation de pollen pour la plupart de microspores (monades, diades, triades, tétrades et polyades). Les grains de pollen qui se forment, ne sortent pas des microsporanges car les cônes mâles restent fermés et avortent après un dépérissement. En revanche, les cônes mâles du cyprès homozygote étudié se sont arrêtés au stade de cellules mères sans initier la méiose ou présenter des anomalies méiotiques qui empêchent la majorité des microspores de former le pollen. Les cônes de ce cyprès dépérissent et finissent par avorter. Les irrégularités observées sont attribuées à une mauvaise ségrégation de chromosomes pour les haploïdes et à l'expression d'allèles récessifs délétères pour l'individu homozygote. Le comportement du diploïde homozygote n'est sans doute pas généralisable mais il indique que des individus stériles peuvent être trouvés au sein de ces homozygotes.

Le suivi des cyprès analysés doit être poursuivi afin de vérifier la stabilité de leur comportement reproductif. Il faudrait également mener des études sur la production de cônes mâles et leur viabilité ainsi que sur la microsporogénèse chez les autres cyprès *C. sempervirens* issus de la stratégie « mère porteuse » de *C. dupreziana*.



Figure 28. Cônes mâles chez un cyprès *C. sempervirens* diploïde homozygote (a) et leur comparaison (b) avec ceux d'un cyprès *C. sempervirens* haploïde (circle). Cyprès *C. sempervirens* avec des cônes mâles plus gros (c, d), et rameaux avec les deux cônes (mâle et femelle) (e - j).

CHAPITRE 3. RESSOURCES GÉNÉTIQUES

CHEZ *Cupressus dupreziana* A. CAMUS

Ce chapitre est dédié aux ressources génétiques chez *Cupressus dupreziana* A. Camus ou cyprès du Tassili. D'abord, on présente un inventaire de l'espèce, *in-situ* et *ex-situ*. Ensuite, on aborde l'aspect de la diversité avec l'analyse faite en utilisant des marqueurs nucléaires codominants (microsatellites). Enfin, on discute sur les conséquences de la reproduction par apomixie paternelle.

3.1 Les ressources dans l'aire naturelle

Après la découverte du cyprès du Tassili en 1924 par le capitaine Duprez et jusqu'au milieu des années 40 le nombre exacte d'arbres dans l'aire naturelle restait inconnu, on pensait que le cyprès du Tassili n'était représenté que par une dizaine d'arbres vivants et que leurs graines étaient stériles (Maire 1952). Mais, dès 1943, des jeunes pousses ont été rencontrées sous les vieux arbres (Maire 1944, Leredde 1957, Simonneau et Debazac 1961). En 1949, le professeur Bernard donnait le nombre de 200 arbres vivants (Bernard 1953).

Le recensement de *Cupressus dupreziana* s'est étendu sur plusieurs décennies, même si entre 1950 et 1965 diverses missions écologiques, archéologiques et botaniques, se sont intéressées au cyprès (Leredde 1957, Lhote 1964, Laferrère 1969). En effet, pour le comptage des arbres vivants les informations étaient le plus souvent de simples indications du nombre d'individus par oued et une mauvaise transcription de la toponymie, ne permettaient pas l'identification ultérieure des arbres et donc le suivi de leur évolution (Abdoun et Beddiaf 2002).

Barry *et al.* (1970), ont recensé 83 cyprès (Tableau 14) en 1965 selon un itinéraire précis d'Oued en Oued (Figure 29), dans le plateau gréseux de l'Edjeri du Tassili N'Ajjer. Ils ont décrit et numéroté chaque individu afin de les reconnaître parfaitement. Les cyprès vus vivants ou morts ont été numérotés dans l'ordre chronologique de leur observation, et l'indication de leur circonférence ainsi que de leur hauteur font partie de leur brève description. Les travaux de Barry et collaborateurs ont servi de référence aux travaux qui suivirent.

Tableau 14. Nombre des cyprès recensés par Oued dans le plateau gréseux de l'Edjeri.

Oued	Nombre de cyprès	Comentaires
Tamrit	22	C'est une exception dans l'ensemble du réseau hydrographique du plateau d'Edehi, car il coule vers le Nord-Ouest, puis il s'infléchit vers l'Ouest, et se perd à travers une entaille de la grande muraille tassilienne. Son cours ne doit pas excéder cinq kilomètres.
Sefar	1 (mort)	Existence d'un cyprès mort et en partie brûlé.
Tin Aliouane	2 (dont un mort)	Présence d'un cyprès mort et partiellement brûlé dans le lit même de l'Oued ainsi que d'un bon spécimen en bon état et ayant abondamment fructifié ; il mesurait à l'époque 18 mètres.
Adjendjoum	1	Il était en très bon état et il fructifiait.
Riey	4	Le plus petit mesurait à l'époque 11 mètres.
Tessouanet	2	Deux arbres jumeaux en bon état. Ils avaient une circonférence de 2.80 mètres en 1965.
Iagarohane	27	Cet Oued constitue la plus remarquable des stations à cyprès de Duprez. A cet endroit, la végétation est très dense. Les cyprès se situent sur une distance totale inférieure à 3 Km.
Amazar	16	Sa large vallée s'oriente en direction Sud-Est durant une quinzaine de kilomètres, jusque dans la région de l'Aguelmane Tin Krelifat.
Djabbaren	8	

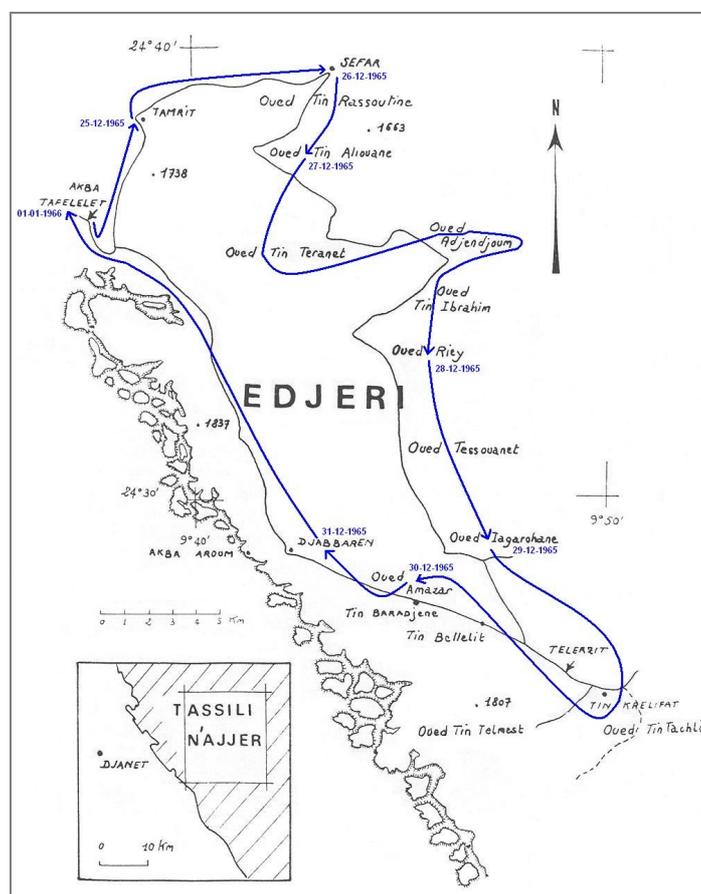


Figure 29. Itinéraires suivis sur le plateau de l'Edjeri (d'après Barry *et al.* 1970).

Entre 1971 et 1972, le forestier Saïd Grim (Grim 1992) a réalisé le premier inventaire complet des cyprès (localisation, description et numérotation) en reportant 230 arbres vivants et 153 arbres morts sur pied. La mise au jour de cet inventaire, entre 1997 et 2001, par

Abdoun et Beddiaf (2002) a permis de délimiter dans l'aire naturelle la distribution spatiale des populations de *Cupressus dupreziana* (Figure 30). Ils ont observé aussi une vingtaine d'arbres dépéris (parmi ceux reportés comme vivants par Grim), d'âges variables. Leur taille varie entre 0,70 et 8 m de circonférence ; sur la majeure partie d'entre eux sont visibles les traces de mutilations et d'émondage pastoral ; certains ont été brûlés. Cependant, le cas de quelques arbres demeure inexplicable, car ils ne présentent pas de signe d'une fatale intervention humaine. Leur mort peut être imputée à la sécheresse.

D'autre part, Abdoun et Beddiaf (2002) ont trouvé 23 autres cyprès vivants. Le nombre des arbres vivants est alors de 233 dont une dizaine de jeunes individus qui attestent une régénération spontanée. Toutefois ces arbres sont généralement très âgés, jusqu'à 2400 ans parmi les arbres étudiés par Abdoun et collaborateurs (2005). Les cyprès sont répartis sur une bande de 120 km de long et 6 km (en moyenne) de large, longeant la bordure sud-ouest du plateau du Tassili N'Ajjer (au nord-ouest, 25°5' N, 9°1' E ; au sud-est, 24°19' N, 9°50' E), entre 1430 et 1830 m d'altitude. La distribution spatiale des cyprès semble hétérogène et paraît suivre des conditions topographiques particulières, fuyant les zones de plaines pour se contracter dans des fonds de canyons profonds ou des sommets de montagnes.

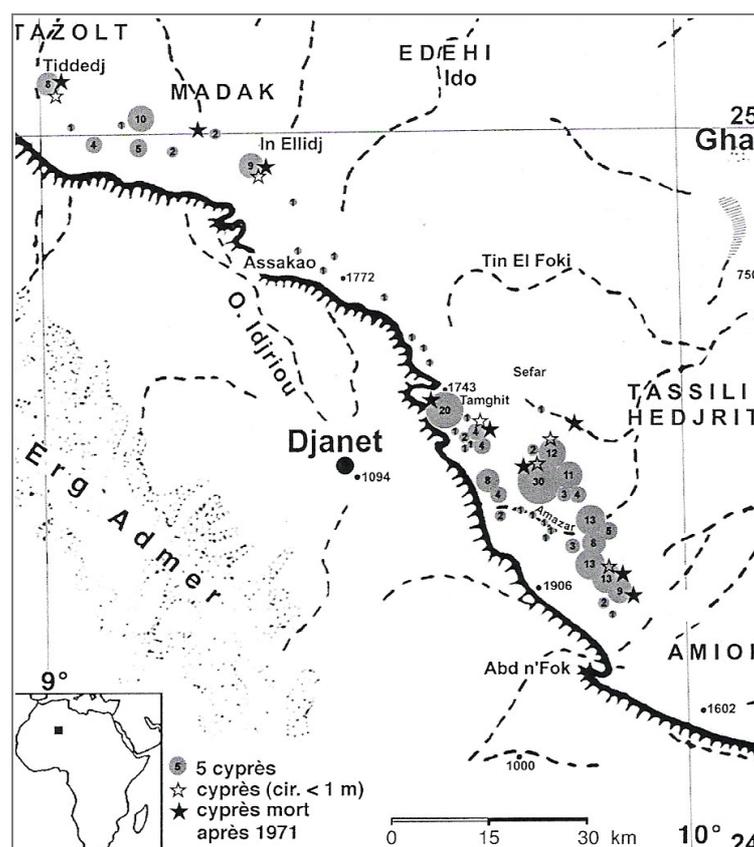


Figure 30. Distribution spatiale des 233 cyprès *Cupressus dupreziana* au Tassili n'Ajjer. La zone entre le Sud d'In Ellidj et le Nord de Tamghit est caractérisée par des cyprès isolés (d'après Abdoun et Beddiaf 2002).

3.2 Les ressources hors de l'aire naturelle

Dès que l'existence d'un cyprès au Tassili des Ajjers fut devenue une certitude, les botanistes essayèrent de se procurer des graines, des boutures ou de greffes en vue de conserver l'espèce et/ou de l'étudier. Laguerre (2006), dans cadre d'un mémoire de Master 1 accompagnant la présente thèse, a réalisé un inventaire des ressources de ce cyprès en France (Anexe 1 et 2) et dans quelques autres pays hors de son aire naturelle. Le travail a consisté à rassembler les informations parfois présentes dans la bibliographie ou le plus souvent mener des enquêtes auprès des différents partenaires et instituts, publics ou privés, impliqués dans la conservation de l'espèce. Nous en reprenons ici les principaux résultats.

3.2.1 Le cyprès du Tassili en France

Le botaniste Leredde, qui fit parti de la mission du Tassili avec R. Maire, planta des graines et réussit ses semis à Toulouse en 1949 (Barry *et al*, 1970). En 1959, le professeur Laferrère est allé dans le massif du Tassili et a identifié les exemplaires vivants. Il a rapporté quelques graines pour les jardins botaniques français : le jardin de la Tête d'Or à Lyon, le jardin de la Faculté de Toulouse, le jardin Les Cèdres à St Jean Cap Ferrat, et la villa Thuret à Antibes. La germination très faible de ces derniers a produit quelques petites pousses, dont trois sont à la villa Thuret. Plus tard, d'autres graines ont été rassemblées, surtout pendant la mission du professeur Barry. Une première collection a été recueillie par la F.A.O. à l'Institut de Recherches Forestières en Tunisie. Cette collection a été reproduite et sauvée afin de constituer la base d'arboretum en France à l'AFOCEL et à l'INRA dans le massif de l'Estérel (285 arbres, représentant 35 clones et 6 descendances). Cet arboretum a été conçu pour l'étude de l'espèce, et pour agir en tant que verger de graines (Auge, Ducatillion, 1991). Plusieurs collections du cyprès *Cupressus dupreziana* ont été alors réalisées en France dans les Jardins Botaniques et les Instituts ; on peut également rencontrer des exemplaires de cette espèce dans les jardins de quelques particuliers mais leur origine est très diverse (Laguerre 2006). La synthèse des ressources par département est dans le Tableau 15. L'ensemble des ressources françaises représenterait 1027 individus d'origines diverses et dont la représentativité des ressources de l'aire naturelle est mal connue.

Tableau 15. Synthèse des ressources du cyprès du Tassili en France (Laguerre 2006).

Département	Lieu de plantation	Nombre de cyprès	Comentaires
	Antibes	3	Ils se situent dans le Jardin de la Villa Thuret ; ils ont été plantés en 1961, les graines appartenaient à M. Laferrère. Par la suite, quelques boutures ont été réalisées et réussies.
Alpes-Maritimes	Antibes-Massif de l'Estérel	307	Ils proviennent de l'AFOCEL et les clones ont transité par la Tunisie. Il constitue la collection du Tassili.
	Menton	1	Il se situe au Val Rameh. Origine inconnue.
	Saint-Jean-Cap-Ferrat	9	Ils se situent à la Villa « Les Cèdres », dans le Jardin Botanique de M. Marnier Lapostolle. Ils proviennent d'un semis de graines envoyées par M. Laferrière en 1960. Par la suite 6 plants ont été produits par voie végétative.
	Vallauris Golfe-Juan	Au moins 1	Il se trouve dans l'Arboretum Centre Hélio-Marin. Il provient de la pépinière des Milles (Aix-en-Provence).
Aude	Villardebelle	20	Ils sont localisés dans l'Arboretum de Villardebelle. 10 sujets proviennent de l'INRA.
Bouches-du-Rhône	Aix-en-Provence	84	Ils se trouvent dans la forêt départementale de Cadarache, la plantation a été réalisée par l'INRA. Sa pépinière d'origine se trouve au Ruscas.
	Aurons	148	Plantation réalisée par l'INRA.
	Roquevaire	3	
Cantal	-	2	Un provient du Ruscas et l'autre a été enregistré aux Barres.
Essonne	Dourdan	1	Il appartient au Pr. Hubert Gillet, son origine est inconnue.
	Orsay	6	Ils ont été plantés dans les serres de l'Institut de Botanique de la Faculté des Sciences. Les graines sont issues des récoltes de cônes faites en décembre 1965.
Eure	Arboretum d'Harcourt	1	Son origine est inconnue.
Gard	Anduze	1	Il se trouve à la Bambouseraie de Prafrance.
Haute-Garonne (selon Barry <i>et al.</i> 1970)	Toulouse	8	Ils se situent au Laboratoire de Botanique, à l'ancienne faculté des Sciences. L'un est cassé et réparti en « baïonnette » et l'autre est intact. Les pieds sont issus des récoltes faites par Cl. Leredde en 1949. Essais de plantation avec des graines provenant du Pr. Barry, récoltées en 1966 : faculté germinative faible, 6 plantules ont été obtenues en 1970.
		1	Il a été planté au Jardin de l'Observatoire. Il provient de la seconde récolte de M. Leredde, faite en 1952.
		1	Il a été planté dans le Jardin particulier de Monsieur Camichel. Il provient de la seconde récolte de M. Leredde, faite en 1952.
Hérault	Montpellier	7	Ils se situent dans le Jardin Botanique de Montpellier. Les graines ont été récoltées par Mme Perrière.
	Pignan	47	Ils appartiennent à l'AFOCEL.
Isère	Eyzin-Pinet	1	Il se situe à 350 m d'altitude dans la propriété de Monsieur A. Monjauze.
	St Barthélémy de Séchilienne	1	Il se trouve chez un privé, son origine est inconnue.

Tableau 15. Continuation.

Département	Lieu de plantation	Nombre de cyprès	Comentaires
Loiret	Noget sur Vernisson	2	On peut les voir à l'Arboretum des Barres.
Manche	Quettehou	1	Il est dans la propriété de Monsieur le Docteur Ch. Favier. Les graines ont été récoltées Par C. Leredde en janvier 1953 à Tamrit, il a été planté à Toulouse et, en 1961, il a été envoyé à M. Favier.
	Lyon	3	On les localise dans le Jardin Botanique du Parc de la Tête d'Or. Les 3 spécimens ont été greffés sur <i>Cupressus Arizona</i> . Les greffons et boutures proviennent du Liban.
Rhône	St Cyr au Mont d'Or	1	Il appartient au frère aîné de M. Laferrière, mais son origine est inconnue.
	Tour de Salvigny	1	Il appartient à un particulier et son origine est inconnue.
Var	Domaine de Ruscas	2	Ils appartiennent à l'INRA.
	Ravin des caunes (près de Ruscas)	201	Ils proviennent de la collection de l'AFOCEL c'est-à-dire qu'ils sont originaire du Tassili. Ils appartiennent à l'INRA.
Vaucluse	Abbaye de Sénanque	1	Le sujet provient de la Villa Thuret planté le 6 juillet 1969 dans le Jardin du Musée Saharien.
	Avignon	1	Il se situe près de la gare SNCF, son origine est inconnue.
	Carpentras	50	Ils se trouvent à la Pépinière Rey. Ils proviennent de deux clones : les 29 premiers du Tamrit et les 31 suivant du Hoggar.
	Malaucène	75	Ils se trouvent au Grozeau. Ils ont été plantés par l'INRA en 2004 ; leur origine est diverse : aire naturelle ou collection du Sud-Est de la France.
	Montfavet	Environ 40	Ils se situent à l'intérieur de l'Hôpital. Ils ont été plantés par l'INRA en 2004 ; leur origine est diverse : aire naturelle ou collection du Sud-Est de la France.
« Inconnu »	Villevières (écriture incertaine !)	1	

3.2.2 Le cyprès du Tassili dans les autres pays

R. Maire, un botaniste planta des graines en 1926 au Jardin Botanique de la Faculté des Sciences d'Alger ; les graines y donnèrent des exemplaires normaux et vigoureux. Plusieurs autres collecteurs eurent la possibilité d'accéder au plateau d'Edehi et de ramener des cônes ou des graines du cyprès de Duprez (Barry *et al*, 1970). Les données des pays possédant le cyprès *Cupressus dupreziana* (Tableau 16) datent de 1970 (Barry *et al*. 1970) et donc il peut y avoir à l'heure actuelle certaines modifications.

Tableau 16. Pays possédant le cyprès du Tassili (d'après Barry *et al.* 1970).

Pays	Lieu de plantation	Nombre de cyprès	Comentaires
	Alger : Jardin de l'Université dans le jardin dit « Mexicain »	2	Mésures en 1970 : hauteur = 5.8 m et 4 m, diamètre du tronc à 20 cm du sol = 9 cm et 5.5 cm, diamètre du feuillage = 1.5 m et 0.9 m). Ils ont été plantés par M. le professeur P.QUEZEL en 1961 ; graines récoltées par M.LAFERRERE.
	Bainem (près d'Alger) : Arboretum des Eaux et Forêts	Environ 15	Ils sont issus des graines collectées en 1961. Les dimensions variaient en 1970 entre 1 et 2 mètres de haut pour une circonférence à ras du sol de 5 à 15 centimètres.
	Constantine : Parc du Service des Eaux-et-Forêts	Environ 10	Ils sont issus des graines collectées en 1961. Ils mesuraient tous environ 1 mètre.
Algerie	Djanet : Jardin du Beylik à Adjahil	21	Leurs tailles variaient de 4 centimètres à 17.6 centimètres.
	Djanet : Jardin de l'Organisation saharienne	1	Il mesurait environ 1.50 mètres en 1970.
	Tamanrasset : Jardin de la communauté des Frères de Foucault	3	
	Assekrem : Communauté des Frères de Foucault	1	Il mesurait 75 centimètres en 1970.
Tuinisie	Ariana, Djaffar et Um Djeddour	30	Grâce à une technique de multiplication végétative, l'Institut de Reboisement de Tunis a constitué une collection de 30 clones qui, multipliés par bouturage et greffage sur <i>Cupressus sempervirens</i> , ont permis l'installation de trois vergers à graines installés respectivement à Ariana, Djaffar et Um Djeddour. Les cyprès étaient très vigoureux et atteignaient environ deux mètres en 1970 pour ceux les plus anciennement greffés (en 1966).
Liban	Jamhour (près de Beyrouth)	2	Ils se trouvent à 400 m.ètres d'altitude et mesuraient environ 5 mètres de haut. Ces pieds sont issus de graines récoltées par Cl. LEREDDE en 1952, plantées en 1953.

3.2.3 Les pays ayant essayé de cultiver des *Cupressus dupreziana*

Comme le cyprès *Cupressus dupreziana* a été introduit que dans un périmètre restreint : Algérie, Tunisie, Liban et France, certains botanistes ont souhaité étendre et multiplier les points de cultures de cette espèce en voie d'extinction dans son aire naturelle. Ceci a été réalisé dans le cadre du Laboratoire de Botanique de la Faculté des Sciences d'Alger. Quatorze demandes des graines de *Cupressus dupreziana*, par différents pays, ont été faites. Barry *et al.* (1970) ont décrit les résultats de ces expérimentations (Tableau 17).

Tableau 17. Résultats des pays ayant essayé de cultiver le cyprès du Tassili (d'après Barry *et al.* 1970)

Pays	Organism	Résultat	Comentaires
Australie	Waite Agricultural Research Institute, Glen Osmond	positif	Quelques rares germinations, mais les plantules ont péri par suite d'une fonte de semis
France	Jardin Botanique de la Ville de Toulouse	positif	Quelques rares germinations
Tchécoslovaquie	Arboretum Mlynany, Slepčany	positif	Une dizaine de germinations obtenues en «serre japonaise», mais mortes accidentellement en raison d'une panne de chauffage
Tunisie	Institut de Reboisement de Tunis à Ariana	positif	Un seul plant obtenu, mort ensuite accidentellement
France	Institut de Botanique de la Faculté des Sciences d'Orsay	négatif	Aucune germination n'a été obtenue
France	Jardin Botanique de la Ville de Rouen	négatif	Aucune germination n'a été obtenue
Brésil	Instituto de Botanica, Sao paulo	négatif	Aucune germination n'a été obtenue
Italie	Istituto ed Ordo Botanico d'ell'Universita di Palermo	négatif	Aucune germination n'a été obtenue
Singapour	Botanic Gardens, Singapore	négatif	Aucune germination n'a été obtenue
Suède	Hortus Botanicus Bergianus, Stockholm	négatif	Aucune germination n'a été obtenue
Italie	Istituto ed Ordo Botanico d'ell'Universita, Parme	inconnu	
Tchécoslovaquie	Hortus Botanicus, Kosice	inconnu	
U.R.S.S	Hortus Botanicus Instituti Botanici Komarovii, Leningrad	inconnu	
U.R.S.S	Hortus Botanicus Nikitensis, Yalta, Crimée	inconnu	

3.3 Diversité génétique de l'espèce

3.3.1 Matériel et méthode

Les cyprès de Duprez analysés proviennent de trois origines différentes :

- a) Semis issus de graines récoltées sur des cyprès du Tassili de l'aire naturelle et gracieusement fournies par Fatiha Abdoun ou par l'INRF d'Alger.
- b) Semis issus de graines récoltées sur des cyprès du Tassili en collections *ex-situ*.
- c) Arbres en collections *ex-situ* en France.

Nous avons *a priori* différencier les origines b et c, correspondant toutes deux à des situations *ex-situ*, car dans le second cas, les graines à l'origine des arbres peuvent provenir de l'aire naturelle. Des échantillons témoins des deux autres cyprès méditerranéens (*C. sempervirens* et *C. atlantica*) ont également été analysés (Tableau 18).

Tableau 18. Origine des cyprès étudiés à l'aide de microsatellites nucléaires.

Espèce	Origine	Niveau génétique	Effectif
<i>C. dupreziana</i>	a) Graines, Tassili N'Ajjer, Algérie	a) 10 mères	56
	b) Graines, collections France	b) 13 mères	98
	c) Arbres, collections <i>ex-situ</i> France	c) 66 individus + 6 descendants	82
			total = 236
<i>C. atlantica</i>	Peuplement de l'Aghbar, Haut Atlas, Maroc	1 provenance	9
<i>C. sempervirens</i>	Collections France	12 individus	12

Les marqueurs moléculaires utilisés pour cette analyse sont 7 microsatellites nucléaires développés par Sebastiani *et al* (2005). Ces marqueurs ont été présentés au paragraphe 2.3.1 (Rivera Nava *et al.*, soumis).

3.3.2 Résultats

La diversité génétique de l'espèce *C. dupreziana* est très inférieure à celles observées chez les deux autres espèces, *C. atlantica* et *C. sempervirens*. Le nombre d'allèles par locus est beaucoup plus faible malgré le nombre 20 fois plus important d'individus échantillonnés

chez *C. dupreziana* (Tableau 19). Le polymorphisme est particulièrement élevé chez le cyprès de l'Atlas, mais, pour certains locus, il pourrait être légèrement surestimé car des allèles ne variant que d'une base ont été notés alors que le microsatellite a un motif à deux nucléotides. Ce résultat confirme la forte variabilité génétique observée chez *C. atlantica* à l'aide de marqueurs enzymatiques et AFLP (Bechir *et al.* 2003 et 2004).

Tableau 19. Diversité et effectifs alléliques aux 7 marqueurs microsatellites.

Cyp84																			
	230	232	233	236	238	240	242	244	246	248	250	252	256	258	262	263	267	268	274
ca	1	0	1	2	2	0	1	0	2	0	1	1	1	1	1	1	2	1	1
cd- a	0	0	0	0	0	56	0	0	0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cd- b	0	0	0	0	0	97	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cd-c	0	0	0	0	0	80	0	0	0	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cs	0	1	0	0	2	0	6	1	1	11	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Cyp101																			
	172	178	182	184	188	196	198	200	202	214	220	222	226						
ca	1	1	2	1	1	2	1	3	2	1	1	1	1						
cd- a	0	0	0	56	0	0	0	0	0	56	0	0	0						
cd- b	0	0	0	97	0	0	0	0	0	97	0	0	0						
cd-c	0	0	0	81	0	2	0	0	0	79	0	0	0						
cs	0	0	7	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
Cyp174																			
	183	202	206	208	210	213	214	215	219	221	229	231	233						
ca	3	2	0	0	0	2	0	5	5	1	0	0	0						
cd- a	56	0	0	0	0	0	0	0	2	0	30	0	24						
cd- b	98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	1	0						
cd-c	81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	76	0	5						
cs	0	0	2	10	2	0	10	0	0	0	0	0	0						
Cyp52																			
	166	167	168	172	173	174	186	187	195	211	213								
ca	6	2	2	2	1	2	0	1	1	1	0								
cd- a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	106	6								
cd- b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	194	0								
cd-c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	162	0								
cs	0	0	0	0	0	21	3	0	0	0	0								

Cyp293																			
	174	175	176	177	178	180	182	184	185	186	187	196	198	200	201	202			
ca	1	3	5	2	2	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0			
cd- a	0	0	0	0	0	0	0	56	0	0	0	0	55	0	0	1			
cd- b	0	0	0	0	0	0	0	98	0	0	0	0	98	0	0	0			
cd- c	0	0	0	0	0	0	0	81	0	0	0	0	83	0	0	0			
cs	0	0	0	0	0	0	0	10	11	2	1	0	0	0	0	0			
Cyp257																			
	154	158	159	163	165	166	172	183											
ca	10	1	0	0	0	6	1	0											
cd- a	0	52	0	0	0	52	0	0											
cd- b	0	97	0	0	0	97	0	0											
cd- c	0	69	0	0	0	69	0	0											
cs	0	0	5	15	2	0	0	2											
Cyp258																			
	226	228	230	234	242	250	262	270	276	280									
ca	2	1	9	0	1	2	0	1	1	1									
cd- a	56	0	0	0	0	0	56	0	0	0									
cd- b	98	0	0	0	0	0	98	0	0	0									
cd- c	78	0	0	0	0	0	78	0	0	0									
cs	14	0	8	1	1	0	0	0	0	0									

Chez *C. dupreziana* pour 6 des 7 locus, 2 allèles sont très majoritaires et souvent seuls présents, en fréquences équivalentes (50 %, 50 %). Le septième marqueur, *Cyp52*, montre un allèle majoritaire présent à 95 % dans les échantillons issus de l'aire naturelle (cd-a) et à 100% dans les autres.

L'analyse des génotypes met en évidence une très forte hétérozygotie pour l'ensemble des échantillons de cyprès du Tassili (6 locus sur 7) supérieure à l'hétérozygotie moyenne des deux autres cyprès méditerranéens (Figure 31).

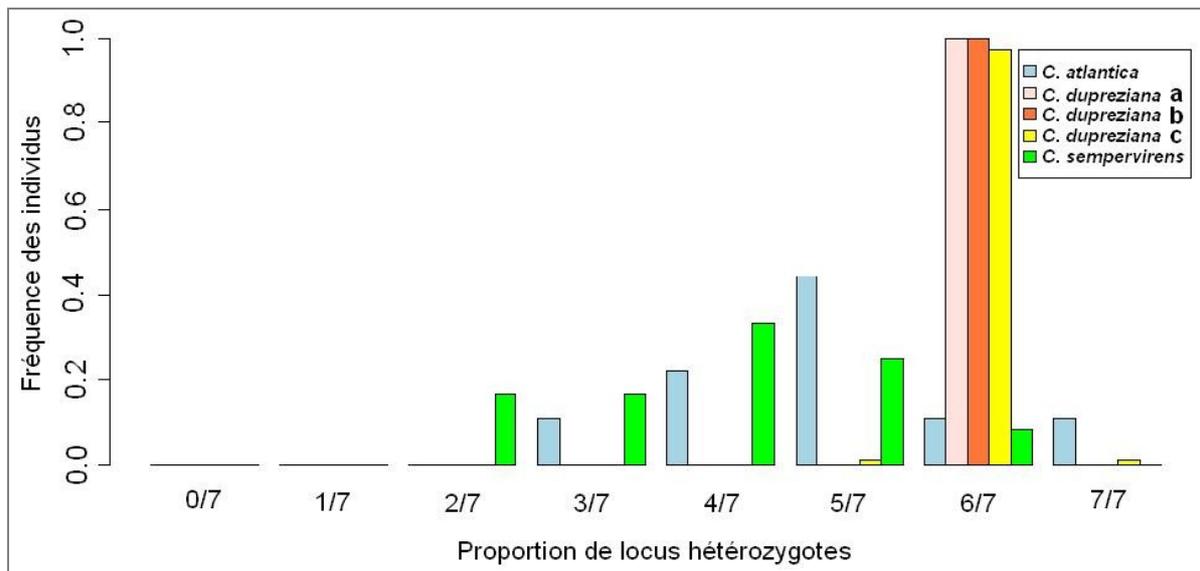


Figure 31. Distribution de l'hétérozygotie individuelle. a) Graines, Tassili N'Ajjer, Algérie. b) Graines, collections France. c) Arbres, collections *ex-situ* France.

La diversité entre individus est extrêmement faible et pour chacun des locus il n'existe généralement qu'un génotype hétérozygote associant les deux allèles majoritaires (Figure 32). Au locus *Cyp174*, nous observons 2 génotypes hétérozygotes prépondérants (183-229) et (183-233), en proportions assez équilibrées pour les cyprès issus de graines récoltées dans l'aire naturelle mais très inégales pour les échantillons *ex-situ*. Enfin au locus *Cyp52*, la situation est différente, l'allèle rare (213) ne se rencontre qu'à l'état homozygote, pour 3 individus originaires de l'aire naturelle.

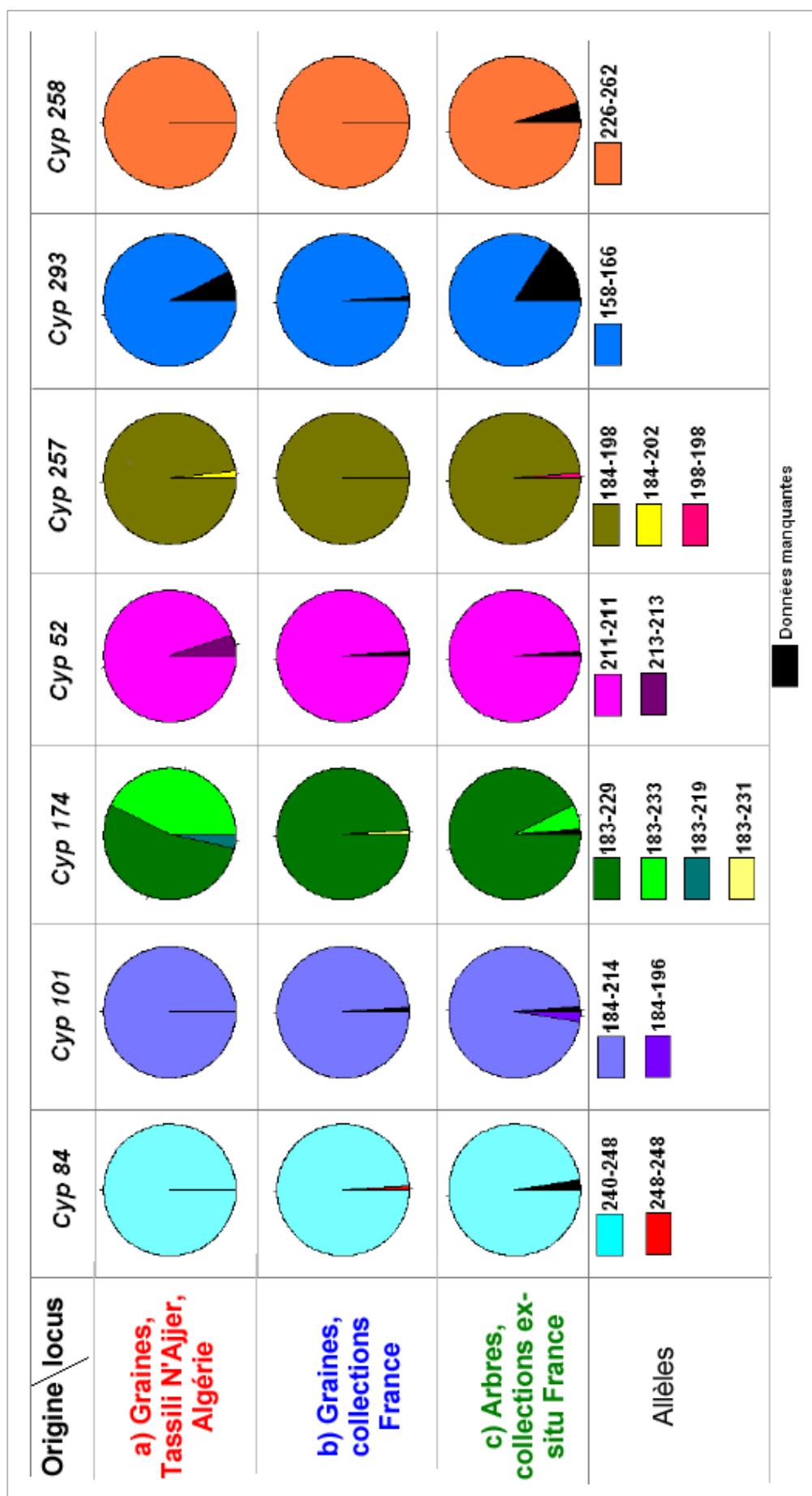


Figure 32. Diversité entre individus pour chacun des locus testés.

L'analyse des génotypes multilocus permet d'appréhender de façon synthétique la diversité chez *Cupressus dupreziana* (Figure 33). Si l'on ne tient pas compte des quelques données manquantes, le génotype 4 : "240/248-184/214-183/229-211/211-184/198-158/166-226/262" est ultra prépondérant et représente 82 % des échantillons. Un second génotype représente 13% des individus et ne diffère que par 1 allèle (9 : "240/248-184/214-183/233-211/211-184/198-158/166-226/262"). Les autres génotypes sont très rares, au plus 2 individus et il conviendrait d'effectuer un nouveau génotypage pour les confirmer.

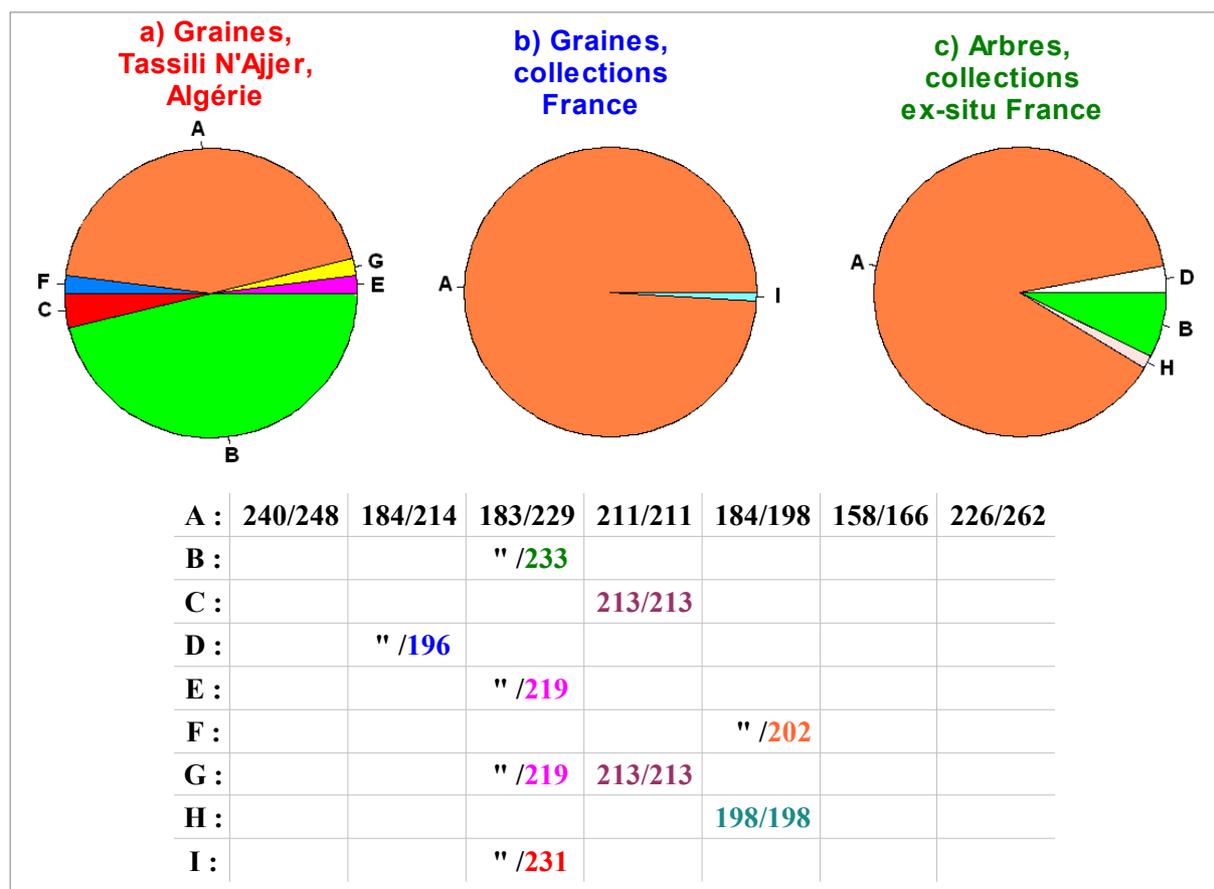


Figure 33. Diversité génétique chez *Cupressus dupreziana*.

L'analyse plus détaillée de la répartition des variants observés (*Cyp174* 183/219, 183/229 ou 183/233 et *Cyp52* 211/211 ou 213/213) au sein des cyprès issus des graines récoltées dans l'aire naturelle (groupe a) montre un effet de l'arbre « mère » (tableau 20) mais pas d'effet géographique évident.

Tableau 20. Diversité au sein des cyprès issus des graines récoltées sur des arbres mères dans l'aire naturelle.

arbre mere	Nom de la population	<i>Cyp174</i> 183/219	<i>Cyp174</i> 183/229	<i>Cyp174</i> 183/233	<i>Cyp52</i> 211/211	<i>Cyp52</i> 213/213
1 : 197-198	El-Badi	0	2	0	0	2
2 : Alg18g	Tamrit	0	1	0	1	0
3 : Alg203	Tin Tarot*	0	5	0	5	0
4 : Alg218	Tin Tarot*	0	1	24	25	0
5 : AlgCd174	Tafettest	0	5	0	5	0
6 : AlgCd179	Amassadjou	0	5	0	5	0
7 : AlgCd6	Tamrit	0	5	0	5	0
8 : AlgCd7	Tamrit	0	5	0	5	0
9 : Tiddejd	Tiddejd	2	0	0	1	1
10 : Tintait	Tin Tatait	0	1	0	1	0

* Il s'agit de deux oueds différents.

Au locus *Cyp174*, les allèles 219 d'une part et 233 d'autre part, n'ont été trouvés que chez les descendants d'un seul cyprès, respectivement « Tiddejd » (arbre mère 9) et « Alg218 » (arbre mère 4). Vingt quatre des 25 descendants de l'arbre « Alg218 » présentent cet allèle 233, le 25ème descendant ayant l'allèle 229.

En ce qui concerne le marqueur *Cyp52*, les 3 seuls génotypes 213/213 ont été observés pour les descendance des arbres « 197-198 » (arbre mère 1) (récoltes de graines sur 2 arbres) et « Tiddejd », arbres géographiquement assez proches, mais pas directement voisins (voir Figure 34). Les quelques variants génétiques se trouvent dans la zone nord de l'aire de l'espèce.

La diversité observée chez le cyprès du Tassili diffère à double titre des celles observées chez les deux autres cyprès méditerranéens et plus généralement chez les arbres forestiers à reproduction sexuée. En effet, on peut dire que l'espèce est à la fois très pauvre (en nombre de génotypes) mais est constituée d'individus particulièrement hétérozygotes.

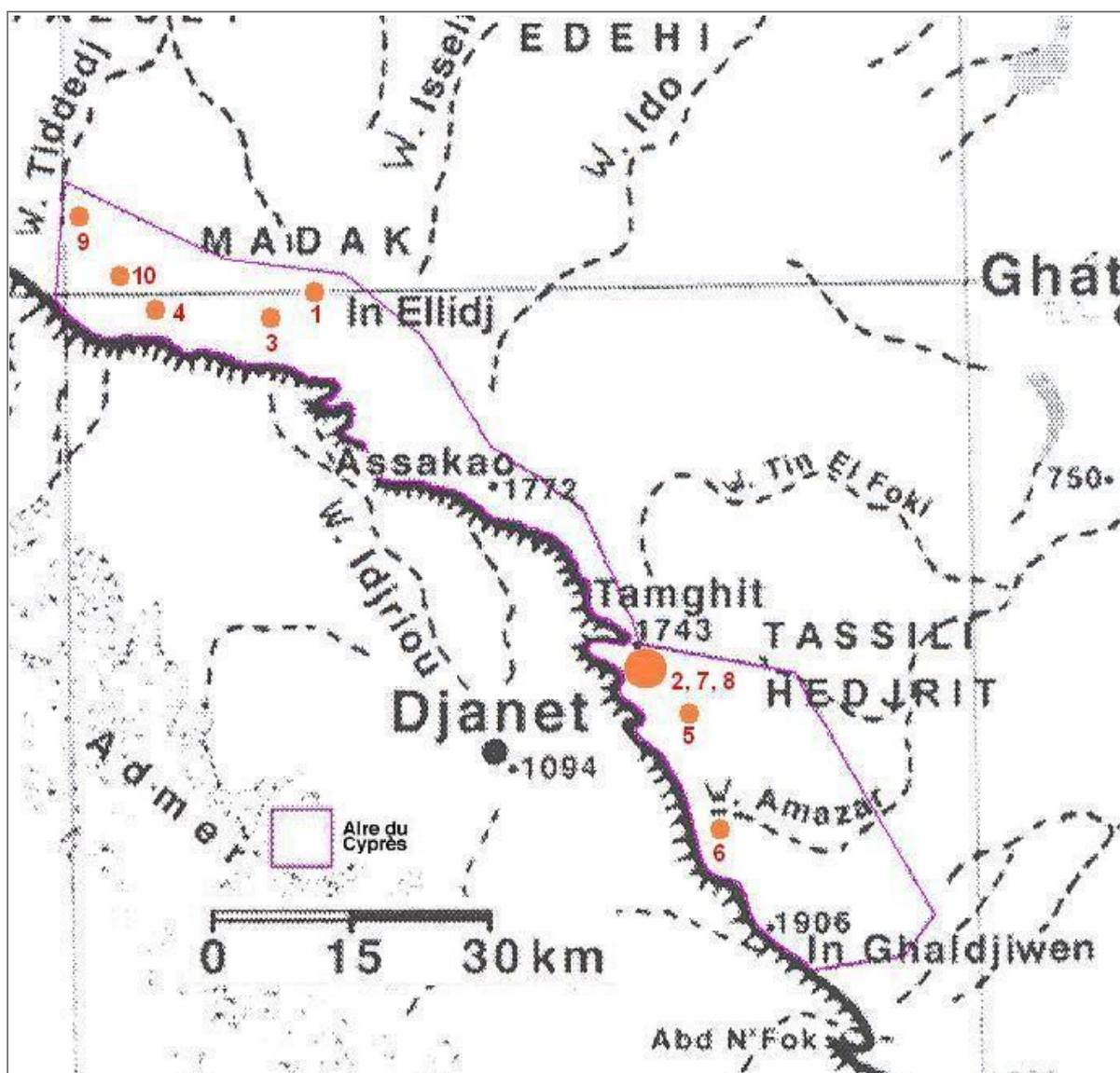


Figure 34. Distribution des arbres mères (voir Tableau 20), dans l'aire d'origine, desquelles les graines qui ont été récoltées sont à l'origine des cyprés analysés avec des marqueurs microsatellites (carte modifiée d'après Abdoun et Beddiaf 2005).

3.4 Interprétation évolutive et gestion des ressources.

Dans les populations de petite taille, la diversité génétique attendue est faible (Frankham, 1996). L'augmentation de la taille de la population ne permet pas de retrouver rapidement un bon niveau de diversité. La faible diversité observée dans une population de grande taille est d'ailleurs un marqueur du goulot démographique (bottleneck) qu'a subi cette population (Nei *et al.* 1975).

D'autre part dans les populations de petite taille la reproduction entre individus apparentés produit des individus consanguins qui expriment plus fréquemment les tares génétiques dues aux allèles délétères récessifs. On observe donc généralement une dépression de consanguinité (inbreeding) dans les populations de petite taille (Keller et Waller, 2002). Au fil des générations, la contre-sélection naturelle des individus les moins adaptés (plus faible fitness) contribue à purger les allèles délétères, mais le risque d'extinction des populations de petite taille reste important.

Lorsqu'une espèce est fragmentée en petites populations isolées, chacune de ces populations subit indépendamment des autres les effets combinés de la consanguinité et de la dérive génétique due au simple hasard. Les populations sont alors fortement différenciées et les individus ont une faible hétérozygotie.

Le cyprès du Tassili est aujourd'hui une espèce constituée de « populations » de très petite taille (parfois un seul arbre) et relativement isolées. Sur une surface d'environ 70 000 ha (120 km x 6 km) seulement 233 arbres ont été inventoriés par Abdoun et Beddiaf (2002). Pour ce genre d'espèce on s'attend à observer une forte différenciation entre populations, une faible diversité au sein des populations et des individus fortement homozygotes. Les résultats obtenus avec les 7 marqueurs microsatellites nucléaires sont opposés : faible différenciation entre populations (et individus) et surtout très forte hétérozygotie individuelle. Cette diversité génétique n'est pas compatible avec une reproduction sexuée classique. En revanche elle est tout à fait cohérente avec l'hypothèse d'une reproduction apomictique généralisée à l'ensemble de l'espèce. Il n'est toutefois pas possible d'affirmer qu'aucun individu ayant une reproduction normale n'existe. En effet, notre étude de diversité est basée sur un échantillon limité d'arbres ou arbres mères dont l'origine, dans l'aire naturelle, n'est parfaitement connue que pour 10 individus (56 descendants). La diversité observée sur l'ensemble des échantillons analysés nous laisse néanmoins penser que la reproduction sexuée classique n'existe plus chez *C. dupreziana*.

La très forte hétérozygotie observée (6 locus sur 7) laisse supposer que l'apparition de génotype(s) apomictique(s) s'est faite dans une population d'assez grande taille, avant un éventuel bottleneck démographique. Son extension dans la population, au détriment des génotypes à sexualité normale, est le résultat de sa plus grande valeur adaptative. La supériorité d'un génotype apomictique par rapport au génotype normal est moins évidente dans le cas d'une apomixie mâle que dans le cas d'une apomixie femelle. En effet, contrairement à l'apomixie maternelle qui ne nécessite que la fonction femelle pour produire un embryon, l'apomixie paternelle nécessite les fonctions mâles (contribution génétique) et femelles (ressources pour le développement de l'embryon) et peut être comparée à la pseudogamie. L'apomixie femelle n'affecte *a priori* pas le nombre d'ovules et donc la fertilité.

La fitness des individus apomictiques est donc double. En revanche si l'on considère une apomixie mâle associée à la production de grains de pollen non réduits issus de dyades et non pas de tétrades (cas du cyprès du Tassili), la fertilité mâle est réduite de 50%. Sur cette base et indépendamment d'un éventuel effet sur la fertilité femelle, la fitness ne serait donc pas différente, mais d'autres facteurs sont susceptibles de procurer un avantage aux individus apomictiques. Le premier facteur serait la plus grande vigueur du pollen diploïde par rapport au pollen réduit. Cette hypothèse s'appuie d'une part sur les observations de germination de pollen effectuées au laboratoire (résultats non publiés) et d'autre part sur les résultats de pollinisation contrôlées de *C. dupreziana* avec des mélanges de pollen $\frac{1}{4}$ diploïdes (*C. dupreziana*) $\frac{3}{4}$ haploïdes (*C. sempervirens*). En effet seuls des plantules diploïdes, *C. dupreziana*, ont été obtenues à partir de ces pollinisations. Le second facteur, serait la dépression de consanguinité chez les individus issus de croisements entre apparentés dans les populations de petites tailles. Chez le cyprès vert, cette dépression a été observée dans le cadre d'autofécondations ; elle affecte la survie et la croissance (Pichot, communication personnelle). Nous avons également pu l'observer chez les cyprès diploïdes homozygotes (voir chapitre 2.4). La propagation des génotypes apomictiques par les grains de pollen, est en revanche favorable à une extension rapide de ces génotypes.

L'hypothèse retenue est celle de l'augmentation de la fréquence des individus apomictiques au sein de populations dont la taille se réduisait. Il est probable que dans un second temps l'espèce ait connu une expansion spatiale grâce à ces individus non sensibles à la démographie. Plus récemment l'aggravation des conditions climatiques et surtout la surexploitation des arbres par l'homme expliquerait le déclin des populations.

Les modèles théoriques développés par McKone et Halpern (2003) démontrent le caractère invasif des allèles contrôlant l'apomixie paternelle, ces allèles finissent généralement par se fixer dans la population. Lorsque cette fixation s'accompagne de la perte de la fonction femelle, l'espèce disparaît. Le risque de disparition est plus élevé chez les espèces dioïques. Selon nos observations, le cyprès du Tassili ne transmettrait effectivement plus ses gènes par la voie femelle et les cônes femelles n'ont conservé qu'un rôle d'alimentation de l'embryon. Quel que soit le site de récolte des graines, la fertilité en terme de graines viables est toujours très faible (de 0 à 10 % pour les meilleurs lots). La conservation d'un certain niveau de fertilité femelle doit être favorisée par la prépondérance de l'auto-pollinisation imposée par l'isolement géographique dans lequel se trouvent la plupart des arbres.

En dehors de la présente étude, il existe très peu d'informations sur la diversité génétique du cyprès du Tassili. Une certaine variabilité phénotypique concernant la couleur du feuillage (teinte plus ou moins verte ou bleuté) voire le port (plus ou moins fastigié) peut être observée en collection et est à l'origine de la sélection de 2 clones commercialisés

(initialement par les pépinières Minier) sous les noms « Tamrit » (cd35=73349) et « Hoggar » (cd33=73347). Dans notre étude ces 2 clones présentent le même profil microsatellite.

La seule véritable autre étude est probablement celle de Ramdani *et al.* (2007) basée sur la diversité des terpènes. Cent soixante arbres ont été échantillonnés dans 11 populations naturelles (dont les populations de Amazar, Tamrit, Tidedje, Tifetest, Tintarout communes à nos travaux) et une plantation à Djanet. L'étude rapporte une variabilité assez importante des compositions terpéniques sans lien clair avec l'origine géographique des échantillons mais en relation avec les conditions environnementales des sites et plus précisément avec la disponibilité en eau. Néanmoins les auteurs considèrent que la forte variabilité des profils terpéniques révèle aussi une « importante réserve de diversité génétique ». Cette affirmation ne nous semble pas vraiment étayée et nos résultats révèlent au contraire une très faible variabilité entre individus. L'étude de la variabilité des terpènes nécessiterait d'être validée avec des échantillons récoltés dans une plantation conservatoire afin d'éliminer les effets liés à l'environnement.

Dans le cadre de la biologie de la conservation le niveau de diversité génétique des populations est utilisé comme indicateur de la « plasticité » de la population (étendue de la niche écologique) et du potentiel d'adaptation génétique. De ce point de vue, le cyprès du Tassili est en situation critique. Toutefois, malgré sa faible diversité génétique il est adapté à une large gamme de milieux. La relation entre diversité (des marqueurs moléculaires) et aire de répartition d'une espèce ne semble pas stricte. Le pin pignon présente également une aire importante pour une diversité extrêmement faible (Vendramin *et al.*, 2008)

La reproduction apomictique du cyprès du Tassili pourrait être considérée comme un facteur aggravant la menace qui pèse sur l'espèce car elle empêche le brassage génétique et donc l'adaptation. Elle doit plutôt être analysée comme étant le facteur qui a permis sa survie. Cette situation, commune aux lignées apomictiques, n'offre pas de perspective sur le long terme (Valen 1975, Carneiro *et al.* 2006, Paun *et al.* 2006). Mais à la différence des espèces qui présentent à la fois des génotypes sexués et d'autres apomictiques, le cyprès du Tassili semble condamné en tant qu'espèce. En effet et sous réserve de confirmation de la disparition de tous les génotypes à reproduction sexuée, l'extinction des lignées apomictiques sera également celle de l'espèce. D'ailleurs si l'on retient pour définition d'espèce à l'ensemble des individus interfertiles, le cyprès du Tassili ne constitue déjà plus un véritable espèce.

Sur le moyen terme, la survie de l'espèce semble fortement dépendre des actions de l'homme en sa faveur. Malgré la grande longévité des individus, la survie dans l'aire naturelle n'est pas assurée en raison de la très faible régénération, des risques de prélèvements (feuillage et/ou de bois) et peut-être de l'évolution du climat. Il est nécessaire de conserver les

ressources dans le cadre de plantations *ex-situ*. Cette opération ne se justifie pas seulement d'un point de vue cognitif par la préservation d'une espèce extraordinaire mais aussi d'un point de vue appliqué en tant que sauvegarde d'une ressource biologique d'un grand intérêt pour les zones arides.

L'inventaire des ressources *ex-situ* montre que l'espèce a fait l'objet de nombreuses plantations. En France il y aurait plus de 1000 arbres de cette espèce. Au sein de ce matériel, la diversité génétique évaluée par les marqueurs microsatellites est particulièrement faible. Le génotype quasi unique est aussi celui qui est prépondérant dans nos échantillons issus de l'aire naturelle. Les variants observés dans la partie nord de l'aire semblent sous représentés dans les collections et il est probable que la très large majorité du matériel en collection provienne de la zone de Tamrit, la plus directement accessible.

Le faible nombre d'arbres encore en vie dans l'aire naturelle et la mauvaise connaissance de l'origine des cyprès présents dans les collections plaident en faveur d'une remobilisation exhaustive des ressources génétiques de cette espèce. Il nous semble important que de nouvelles collections soient établies non pas à partir du matériel *ex-situ* mais à partir de greffons ou graines récoltés dans l'aire naturelle. A cette occasion, le génotypage des 233 cyprès pourrait être facilement effectué. Enfin, la récolte et l'observation de cônes mâles permettrait de confirmer la disparition totale des individus à sexualité normale.

CHAPITRE 4. CONCLUSION GÉNÉRALE

De la sexualité à l'apomixie paternelle

Les êtres vivants n'étant pas immortels, la reproduction est le processus qui permet la perpétuation d'une espèce grâce à la production de descendants. La plupart des individus eucaryotes présente un mode de reproduction sexuée qui leur permet de se diversifier, de s'adapter et d'évoluer. En effet, la reproduction sexuée est avantageuse pour sa capacité à créer à court terme une diversité génétique par recombinaison (Maynard Smith 1978, Barton et Charlesworth 1988, Burt 2000), et pour sa capacité à purger le génome des mutations délétères (Kondrashov 1982, 1988 et 1994, Lynch et al. 1993, Agrawal 2001, Siller 2001, Paland et Lynch 2006). Ces avantages peuvent expliquer la fréquence du sexe dans la nature. Inversement, même si la reproduction asexuée permet la conservation de génotypes adaptés dans une population, l'absence de recombinaison se traduit par l'accumulation des mutations délétères (Müller 1964, Muirhead et Lande 1997, Richards 2003) et aussi en un faible potentiel d'adaptation à long terme (Fisher 1930, Müller 1932, Crow et Kimura 1965). Ces désavantages peuvent expliquer la position phylogénétique terminale de la majorité des lignées à reproduction asexuée (Maynard Smith 1978).

L'apomixie classique (maternelle) est un type de reproduction asexuée, que l'on trouve chez certaines espèces distribuées dans environ 35 familles d'angiospermes (Hanna et Barshaw 1987). Elle permet la continuité des génotypes d'origine maternelle (Asker et Jerling 1992, Koltunow 1993), ce qui offre aussi un grand intérêt appliqué pour l'amélioration d'espèces et la création de nouvelles variétés.

Parmi les types de reproduction asexuée, le plus rare est l'apomixie paternelle. On la trouve chez certains individus de 3 genres d'animaux (*Corbicula*, hybrides interspécifiques de phasmes *Bacillus rossius* et *Bacillus grandii*, et *Drosophila*), et curieusement chez le cyprès du Tassili (seule espèce végétale rapportée) (Mackone et Halpern 2003). A la différence de l'apomixie classique, l'apomixie paternelle serait moins performante car le gamétophyte mâle ne peut pas développer seul un embryon et a besoin d'une mère porteuse. De ce point de vue, elle est équivalente à l'apomixie (maternelle) par pseudogamie.

La stratégie de reproduction par apomixie paternelle chez *Cupressus dupreziana* A. Camus est évidemment unique. En effet, le pollen diploïde (non réduit) du cyprès du Tassili a

une capacité embryogénique, ce pollen non réduit est capable d'utiliser le cyprès vert, espèce très proche, comme « mère porteuse », sans contribution génétique de cette espèce (Pichot et al. 2001). Bien que l'on suppose que l'origine de ce mode de reproduction chez le cyprès du Tassili ait du être dans une période dans laquelle la population était de grande taille, l'information sur l'évolution de l'aire occupée par cette espèce est réduite et ne nous permet pas d'avoir plus de précisions. En effet, des études palynologiques et paléobotaniques menées dans le plateau du Tassili et à proximité (Hoggar) ont démontré la présence de pollen fossile attribué à *Cupressus* cf. *dupreziana* en différentes périodes (Rossignol et Maley 1969). Ces analyses polliniques indiquent que cette espèce existait déjà au moins au Pliocène (Quézel 1965 et 1978, Rossignol et Maley 1969, Schnell 1976). Quézel (1978) fait état du pollen de l'espèce dans la partie Nord du Tchad (Figure 35). Malheureusement ces travaux ne précisent pas les caractéristiques des pollens observés et en particulier leur taille. Il n'est pas certain qu'à cette période le pollen de l'espèce était déjà non réduit.

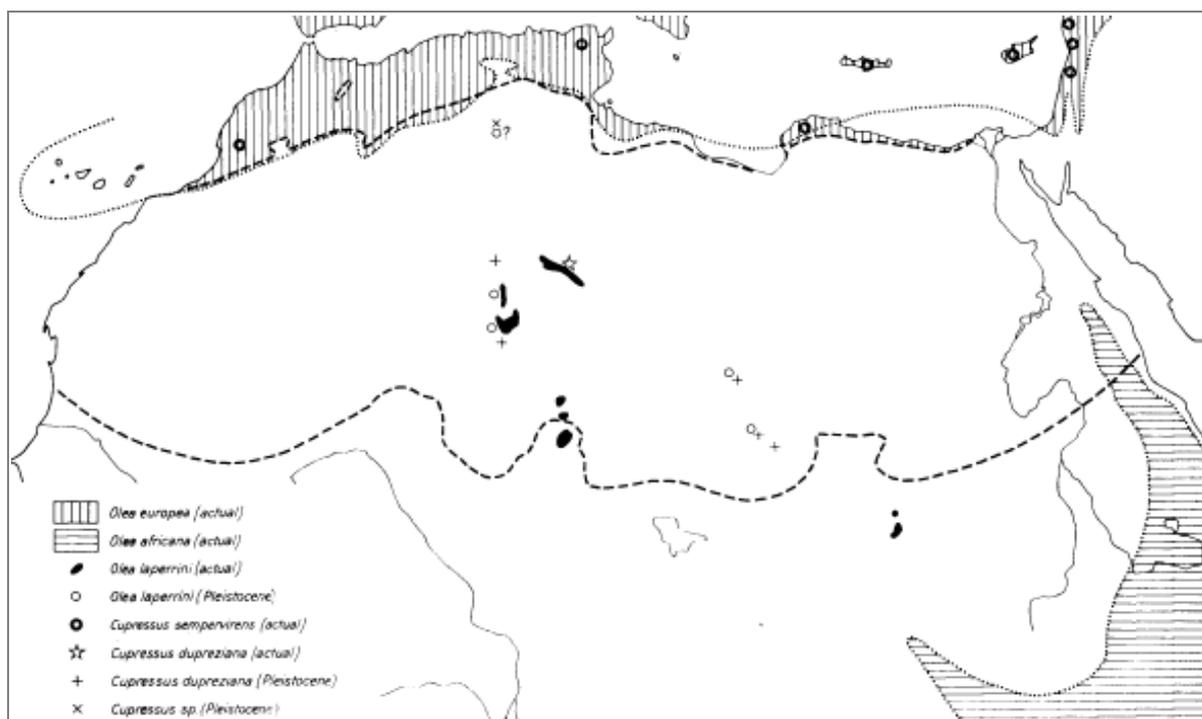


Figure 35. Comparaison entre les espèces montagneuses endémiques du Sahara actuelles et celles trouvées au Pleistocène (d'après Quézel 1978).

L'aire réduite occupée aujourd'hui par l'espèce *C. dupreziana* est attribuée plus à la surexploitation humaine, comme également rapporté pour *Cupressus chengiana* (Hao et al.

2006), qu'aux conditions climatiques. En fait, Thion *et al.* (1996) mentionnent que la flore de l'Holocène moyenne a été très similaire à celle qu'on trouve actuellement.

Sterne et Roche (1994) indiquent qu'il faut porter une attention particulière à la conservation de la variabilité génétique intraspécifique dans les peuplements marginaux et isolés qui possèdent des caractéristiques comme la résistance à la sécheresse et la tolérance aux sols alternatifs et salins. En raison des caractéristiques reproductives particulières de l'espèce, la stratégie de conservation du cyprès du Tassili ne peut être calquée sur les stratégies développées classiquement pour les espèces réduites à un nombre très limité d'individus. La difficile gestion de la consanguinité ne se pose pas ici en raison de l'absence de reproduction sexuée. Il s'agit donc de mettre en place des stratégies de renforcement des effectifs démographiques tout en conservant la faible diversité présente au sein de la ressource naturelle. Il est bien connu que les principales stratégies de conservation des ressources génétiques forestières sont la conservation *in-situ* et la conservation *ex-situ*. Ces deux stratégies doivent être considérées comme partie intégrante des programmes visant à une meilleure utilisation des ressources génétiques forestières et une gestion durable des forêts (Palmberg, 1987). Pour l'espèce *C. dupreziana*, les conditions naturelles difficiles et l'impact humaine font peser des gros risques sur la conservation naturelle de la population. La conservation *ex-situ* est donc indispensable et probablement plus sûre (FAO, FLD, IPGRI 2004). Dans ce sens, il est nécessaire de remobiliser l'ensemble des arbres encore présents dans l'aire naturelle, d'associer l'analyse de leur diversité génétique, et d'installer en Algérie et à l'étranger de nouvelles plantations conservatoires en jardins botaniques ou dans les instituts de recherche.

Sur la production d'haploïdes et homozygotes

Les plantes haploïdes n'ayant qu'un seul lot de chromosomes, un allèle par locus, constituent un matériel important pour les recherches génétiques et cytogénétiques (Lespinasse *et al.* 1983, Zhang *et al.* 1990, Lespinasse *et al.* 1992, Lespinasse *et al.* 1999, Georviev 2008). Ces plantes présentent une forte probabilité de stérilité (Dublin 1972, Gallais et Bannerot 1992, Diettrich *et al.* 2000, Lotfi *et al.* 2003, Pitrat et Foury 2003). Afin de restaurer la fertilité et dans un objectif de produire des lignées pures, leurs chromosomes sont doublés artificiellement (diploïdisation). Cette méthode est largement utilisée en amélioration des plantes afin de produire très rapidement des lignées homozygotes à partir de lignées haploïdes produites par gyno ou androgenèse de tissus haploïdes (Lespinasse *et al.* 1983,

Zhang *et al.* 1990, Lespinasse *et al.* 1992, Lespinasse *et al.* 1999, Lashermes *et al.* 1994, Picard *et al.* 1994, Redha *et al.* 1998, Lotfi *et al.* 2003, Foster *et al.* 2007).

Nos résultats obtenus à partir de l'analyse des descendance issues de cyprès de Duprez, démontrent qu'il est possible d'obtenir naturellement des cyprès verts haploïdes et diploïdes homozygotes en valorisant la stratégie mère porteuse de cette espèce. En effet, on a montré d'une part la capacité qu'a l'espèce *C. dupreziana* d'agir comme « mère porteuse », et d'autre part l'aptitude à l'embryogenèse du pollen de *C. sempervirens*. Cette espèce peut également développer un embryon par apomixie paternelle. Ces cyprès verts, sont à présent de grand intérêt pour les études de génétique (expression de gènes, cartographie) et la production de lignées. Le matériel déjà disponible est actuellement en collection à l'INRA et doit être suivi sur le moyen à long terme. Il faudra notamment sélectionner les géotypes les plus performants en matière d'absence de production de pollen, de croissance et de tolérance au chancre afin de les utiliser comme variétés cultivées non pollinisantes, limitant ainsi les problèmes d'allergie causés par le pollen de Cupressacées (Charpin *et al.* 2005).

BIBLIOGRAPHIE

Abdoun F., Beddiaf M. 2002 *Cupressus dupreziana* A. Camus : répartition, dépérissement et régénération au Tassili n'Ajjer, Sahara central. Comptes Rendus Biologies 325: 617-627. [1]

Abdoun F., Jull A. J. T., Guibal F., Thinon M. 2005. Radial growth of the Sahara's oldest trees : *Cupressus dupreziana* A. Camus. Trees 19 : 661-670. [2]

Agrawal A. F. 2001. Sexual selection and the maintenance of sexual reproduction. Nature 411: 692-695. [3]

Alifriqui M. 1993. Relation station – productivité du cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen) en vue de la conservation des ressources génétiques et l'utilisation dans les reboisements de montagnes sèches. Rapport scientifique de fin de stage dans le cadre de la bourse d'excellence scientifique de l'AUPELF – UREF, 70p. [4]

Allemand P. 1979. Relations phylogéniques dans le genre *Cupressus* (*Cupressaceae*). In: Il Cipresso: Malattie e difesa. Seminario CEEAgrimed, Firenze, Italie. 23-24 novembre. V. Grasso e P. Raddi Ed., 51-67. [5]

Aluka - Bibliothèque numérique de ressources scientifiques venant et traitant de l'Afrique. <http://www.aluka.org/action/showMetadata?doi=10.5555/AL.AP.SPECIMEN.P00375036>. [6]

Araki K., Shinma H., Nagoya H., Nakayama I., Onozato H. 1995. Androgenetic diploids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced by fused sperm. Canadian Journal of Fisheries Aquaculture Science 52: 892-896. [7]

Asker S. E., Jerling L. 1992. Apomixis in Plants. CRC Press. Inc Boca-Raton, Florida, USA. [8]

Auge P., Ducatillion C. 1991. Cultivation on the French Mediterranean coast (the Côte d'Azur) of rare or threatened tropical or sub-tropical trees, two examples : *Jubaea chilensis* and *Cupressus dupreziana*. Tropical botanic gardens : their role in conservation and development. Academic Press, 151-162. [9]

Axelrod D. I. 1958. Evolution of the Madro Tertiary geoflora. Botanical Review 24: 433-509. [10]

Balachowsky A. S. 1955. Une relique rarissime du Sahara Central : le cyprès de Duprez. La Nature 3237: 20-24. [11]

Baldwin H. L. 1931. The period of height growth in some northeastern conifers. Ecology 2: 665-689. [12]

Barry J. P., Belin B., Celles J. C., Dubost D. Faurel L., Hethener P. 1970. Essai de monographie du *Cupressus dupreziana* A. Camus, cyprès endémique du Tassili des Ajjer (Sahara Central). Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord 61, 112: 95-178. [13]

Barshaw E. C. 1980. Apomixis and its application in crop improvement. In: Hybridization of Crop Plants. Eds. H.H. Hadley. ASA-CSSA, Madison-Wisconsin, 45-63. [14]

- Barthélémy D., Grosfeld J., Bouroulet-Hallard F., Ducatillion C. 1999. Biology, growth and development. In: Teissier du Cros E ed. Cypress: a practical handbook. Florence: Studio Leonardo, 26–33. [15]
- Barton N. H., Charlesworth B. 1998. Why sex and recombination? *Science* 281: 1986-1990. [16]
- Bechir A., El Mousadik A., Fady B., Pichot C. 2003. Diversité génétique (AFLP) des peuplements de cyprès naturels et introduits au Maroc. La biodiversité végétale: des plantes pour l'avenir, Association Française pour la Conservation des Espèces Végétales, Villers-Lès-Nancy (FRA), 70-79. [17]
- Bechir A., El Mousadik A., Pichot C. 2004. Diversité allozymique de peuplements de cyprès naturels et introduits au Maroc : conséquences pour la gestion des ressources. *Annals of Forest Science* 61: 669-676. [18]
- Bernard F. 1953. Recherches zoologiques et médicales. Institut de Recherches Sahariennes, Mém. Mission Scient. Mém. Mission Scient. Tassili n'Ajjer I. [19]
- Bicknell R. A., Koltunow A. M. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell* 16: 228-245. [20]
- Brunsfeld S. J., Soltis P. E., Soltis D. E., Gedek P. A., Quinn C. J., Strenge D. D., Ranker T. A. 1994. Phylogenetic relationships among the genera of *Taxodiaceae* and *Cupressaceae*: evidence from *rbcL* sequences. *Systematic Botany* 19: 253-262. [21]
- Burt A. 2000 Perspective: sex, recombination and the efficacy of selection – Was Weismann right? *Evolution* 54: 337-351. [22]
- Camefort H. 1956. Structure de l'apex caulinaire des Gymnospermes. *Annales Biologie* 32: 401-416. [23]
- Campbell D. N. A., Reece J. B. 2004. Biologie. 2e édition. De Boeck Université Publications, 1482 p. [24]
- Camus A. 1914. Les Cyprès (genre *Cupressus*). Monographie – Systématique – Anatomie – Culture – Principaux usages. Encyclopédie Economique de Sylviculture, II, P. Lechevalier Editeur (Paris), 106 p. [25]
- Camus 1926 Camus, A. 1926. Le *Cupressus dupreziana* A. Camus, Cyprès Nouveau du Tassili. *Bulletin de la Société Dendrologique de France* 58: 39-44. [26]
- Cannell M. G. R., Thompson S., Lines R. 1976. An analysis of inherent differences in shoot growth within some north temperate conifers. In M. G. R. Cannell and F. T. Last [eds.], *Tree physiology and yield improvement*. Academic Press London-UK, 173–205. [27]
- Carneiro V. T. C., Dusi D. M. A., Ortiz J. P. A. 2006. Apomixis: Occurrence, applications and improvements. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Global Science Books 62: 564-571. [28]
- Charlesworth D., Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Reviews in Ecology and Systematics* 18: 237-268. [29]
- Charpin D., Calleja M., Lahoz C., Pichot C., Waisel Y. 2005. Allergy to cypress

pollen. Allergy 60: 293-301. [30]

Conifer Specialist Group 2000. *Cupressus dupreziana*. In: IUCN 2007. 2007 IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org>. [31]

Crow J. F., Kimura M. 1965. Evolution in sexual and asexual populations. The American Naturalist 99: 439-450. [32]

Demasly-Feller P., Demasly-Feller M. J. 1990. Les plantes à graines. Structure, Biologie, Développement. Ed. Armand Collin, 175-181. [33]

Diettrich B., Ernst S., Luckner M. 2000. Haploids plants regenerated from androgenic cell cultures of *Digitalis lanata*. Planta Med 66: 237-240. [34]

Dublin P. 1972. Polyembryonie et ploïdie chez *Theobroma cacao*. Café Cacao Thé (Paris) 16: 295-311. [35]

Dublin P. 1973. Haploïdie chez *Theobroma cacao*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série D : Sciences Naturelles 276: 757-759. [36]

Dublin P., Parvais J. P. 1975. Note sur les premiers haploïdes spontanés découverts chez le *Coffea canephora* var. *robusta*. Café Cacao Thé (Paris) 19: 191-196. [37]

Dublin P., Parvais J. P. 1976. L'haploïdie spontanée liée à la polyembryonie chez le *Coffea arabica* L. Café Cacao Thé (Paris) 20: 83-90. [38]

Ducrey M., Brofas G., Andreoli C., Raddi P. 1999. Genus *Cupressus*. In "Il cipresso. Manuale tecnico", ed E. Teissier Du Cros. Firenze, Studio Leonardo, 9-25. [39]

El Maâtaoui M., Pichot C. 2001. Microsporogenesis in the endangered species *Cupressus dupreziana* A. Camus; evidence for meiotic defects yielding unreduced and abortive pollen. Planta 213: 543-549. [40]

El Maâtaoui M., Pichot C., Alzubi H., Grimaud N. 1998. Cytological basis for a tetraspory in *Cupressus sempervirens* L. megagametogenesis and its implications in genetic studies. Theoretical and Applied Genetics 96: 776-779. [41]

FAO, FLD, IPGRI. 2004. Forest genetic resources conservation and management. Vol. 3: In plantations and genebanks (*ex situ*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. [42]

Farjon A. 1998. World Checklist and Bibliography of Conifers. Richmond, U.K.: Royal Botanical Gardens, Kew. [43]

Farjon A. 2005. A monograph of *Cupressaceae* and *Sciadopitys*. Royal Botanic Gardens, Kew. [44]

Ferrandes P. 1979. Les Cyprès Africains (The African Cupresses). In: Il Cipresso: Malattie e difesa. Seminario CEEAgrimed, Firenze, Italie. 23-24 novembre. V. Grasso e P. Raddi Ed., 45-49. [45]

Fisher R. A. 1930. The genetic theory of natural selection. Oxford University Press, Oxford. [46]

Foster B. P., Heberle-Bors E., Kasha K. J., Touraev A. 2007. The resurgence of

haploids in higher plants. *Trends in Plant Science* 12: 368-375. [47]

Frankham R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10: 1500-1508. [48]

Gadek P. A., Alpers D. L., Heslewood M. M., Quinn C. J. 2000. Relationships within *Cupressaceae* sensu lato: a combined morphological and molecular approach. *American Journal of Botany* 87: 1044–1057. [49]

Gallais A., Bannerot H. 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. Editions Quae. [50]

Gaussen H. 1968. Les *Cupressaceae*. In : Les Gymnospermes actuelles et fossiles, Tome II, vol. I, Parties II.2, Fasc. X, Chap. XIII, 326 p. [51]

Gellini R., Grossoni P. 1979. Aspetti botanici del genere *Cupressus*. In: Il Cipresso: Malattie e difesa. Seminario CEEAgrimed, Firenze, Italie. 23-24 novembre. V. Grasso e P. Raddi Ed., 27-43. [52]

Georgiev S. 2008. Haploids in genetic and cytogenetical research. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 22: 644-651. [53]

Gobbi M., Schlichter T. 1998. Survival of *Austrocedrus chilensis* in relation to microsite conditions and forest thinning. *Forest Ecology and Management* 111: 137–146. [54]

Godin C., Costes E., Caraglio Y. 1997. Exploring plant topology structure with the AMAPmod software: an outline. *Silva Fennica* 31: 355-366. [55]

Graniti A. 1998. Cypress Canker: A Pandemic in Progress. *Annual Review of Phytopathology* 36: 91-114. [56]

Grim S. 1992. Inventaire des cyprès du Tassili. *Notices Forestières Brèves* 25: 1-7. [57]

Grossfeld J., Barthélémy D. 2004. Primary growth and morphological markers of interannual growth limits in *Cupressaceae* from Patagonia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 285-293. [58]

Guédon Y., Barthélémy D., Caraglio Y., Costes E. 2001. Pattern analysis in branching and axillary sequences. *Journal of Theoretical Biology* 212: 481-520. [59]

Gustafsson A., Mergen F. 1964. Quelques principes de cytologie et de génétique des arbres. Consultation FAO/IUFRO sur la génétique forestière. *Unasyuva* – No. 73-74. [60]

Hanna W. W., Barshaw E. C. 1987. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science* 27: 1136-11369. [61]

Hao B., Li W., Linchun M., Li Y., Rui Z., Mingxia T., Weikai B. 2006. A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana*, an endangered endemic of China, using ISSR markers. *Biochemical Genetics* 44: 31-45. [62]

Harry D. E. 1987. Shoot elongation and growth plasticity in incense-cedar. *Canadian Journal of Forest Research* 17: 484–489. [63]

Herman F. R. 1956. Growth and phenological observations of *Arizona Juniperus*. *Ecology* 37: 193–195. [64]

Heuret P. 2002. Analyse et Modélisation de Séquences d'Événements Botaniques : Applications à la compréhension de la régularité d'expression des processus de croissance, de ramification et de floraison. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I. [65]

Kayacik H., Yaltrik F., Elicin G. 1979. The floristic composition of the Italian cypress (*C. sempervirens* L.) forest within the Antalyas region in Turkey. *Webbia* 34: 145-153. [66]

Keller L. F., Waller D. M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 230-241. [67]

Kiss J., Kondrák M., Törjék O., Kiss E., Gyulai G., Mázik-Tökei K., Heszky L. E. 2001. Morphological and RAPD analysis of poplar trees of anther culture origin. *Euphytica* 118: 213–221. [68]

Koltunow A. M. 1993. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell* 5: 1425-1437. [69]

Koltunow A. M., Bicknell R. A., Chaudhury A. M. 1995. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. *Plant Physiology* 108: 1345–1352. [70]

Komaru A., Kawagishi T., Konishi K. 1998. Cytological evidence of spontaneous androgenesis in the freshwater clam *Corbicula leana* Prime. *Development Genes and Evolution* 208:46–50. [71]

Komma D. J., Endow S. A. 1995. Haploidy and androgenesis in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92:11884–11888. [72]

Kondrashov A. S. 1982. Selection against harmful mutations in large sexual and asexual populations. *Genetical Research* 40: 325-332. [73]

Kondrashov, A. S. 1988. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336: 435-441. [74]

Kondrashov, A. S. 1994. Sex and deleterious mutations. *Nature* 369: 99-100. [75]

Kozłowski T. T., Ward R. C. 1957. Seasonal height growth of conifers. *Forest Science* 3: 61–66. [76]

Laferrère M. 1969. Laferrère, À propos du cyprès du Sahara planté à Sénanque. *Le Saharien* 53 III et IV, 7–10. [77]

Laguerre C. 2006. Inventaire des ressources d'une espèce menacée : le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A.Camus). Mémoire bibliographique-Master 1. Université d'Avignon. [78]

Lakshmanan K. K., Ambegaokar K. K. 1984. Polyembryony. In: *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, 445–474. [79]

Lashermes P., Couturon E., Charrier A. 1994. Doubled haploids of *Coffea canephora* : development, fertility and agronomic characteristics. *Euphytica* 74: 149-157. [80]

Lavauden L. 1926. Sur la présence d'un cyprès dans les montagnes du Tassili des Azdjers. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* 182: 541–543. [81]

- Leredde C. 1957. Étude écologique et phytogéographique du Tassili n'Ajjer. Institut de Recherches Sahariennes, Mém. Mission Scient. Tassili n'Ajjer II. [82]
- Lespinasse Y., Godicheau M., Duron M., 1983. Potential value and method of producing haploids in the apple tree, *Malus pumila* (Mill.). Acta Horticulturae 131: 223-230. [83]
- Lespinasse, Y., Noiton D. 1986. Contribution à l'étude d'une plante haploïde de pommier (*Malus pumila* Mill.). Etude descriptive et comparaison avec des clones de ploïdie différente. I-Caractères végétatifs : entre-nœuds, feuilles et stomates. Agronomie 6: 659-664. [84]
- Lespinasse Y., Bouvier L., Zhang Y. X. 1992. L'haploïdie chez le pommier et le poirier. Le Fruit Belge 440 : 294-300. [85]
- Lespinasse Y., Bouvier L., Djulbic M., Chevreau E. 1999. Haploidy in apple and pear. Acta Horticulturae 484 : 49-54. [86]
- Lhote H. 1964. L'ancienne forêt de cyprès du Tassili-n-Ajjer (Sahara Central). Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée, XI: 84-90. [87]
- Little D. P., Schwarzbach A. E., Adams R. P., Hsieh C. F. 2004. The circumscription and phylogenetic relationships of *Callitropsis* and the newly described genus *Xanthocyparis* (*Cupressaceae*). American Journal of Botany 91: 1872-1881. [88]
- Little D. P. 2006. Evolution and circumscription of the true cypresses (*Cupressaceae: Cupressus*). Systematic Botany 31: 461-480. [89]
- Lotfi M., Alan A. R., Henning M. J., Jahn M. M., Earle E. D. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Reports 21: 1121-1128. [90]
- Lynch M., Bürger R., Butcher D., Gabriel W. 1993. The mutational meltdown in asexual populations. The Journal of Heredity 84: 339-344. [91]
- Maire R. 1944. Sur la fructification du *Cupressus dupreziana* A. Camus, du Tassili n'Ajjer. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord 35: 12-12. [92]
- Maire R. 1952. Flore de l'Afrique du Nord. Ed. Lechevalier, Paris. [93]
- Maraschin S. F., de Priester W., Spink H. P., Wang M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. Journal of Experimental Botany 56: 1711-1726. [94]
- Maynard-Smith J. 1978. The evolution of sex. Cambridge University Press, Cambridge. [95]
- McKone M. J., Halpern S. L. 2003. The evolution of androgenesis. The American Naturalist 161: 641-656. [96]
- Meeûs T. D., Prugnolle F., Agnew P. 2007. Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects. Cellular and Molecular Life Sciences 64: 1355-1372. [97]
- Mitchell A. F. 1965. The growth in early life of the leading shoot of some conifers. Forestry 38: 121-136. [98]

- Muirhead C. A., Lande R. 1997. Inbreeding depression under joint selfing, outcrossing, and asexuality. *Evolution* 51: 1409-1415. [99]
- Müller H. J. 1932. Some genetic aspects of sex. *The American Naturalist* 66: 118-138. [100]
- Müller H. J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* 1: 2-9. [101]
- Nei M., Maruyama T., Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10. [102]
- Nogler G. A. 1984a. Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed) *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag-Berlin, 475-518. [103]
- Nogler G. A. 1984b. Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Botanica Helvetica* 94:411-422. [104]
- Nogler G. A. 1994. Genetics of gametophytic apomixis - A historical sketch. *Polish Botanical Studies* 8: 5-11. [105]
- Ozenda P., Gaussen H., Le Roy J. F. 1982. *Précis de Botanique - Tome 2 : Les Végétaux Supérieurs*. Ed. Masson-Paris, 89-120. [106]
- Paland S., Lynch M. 2006. Transitions to asexuality result in excess amino acid substitutions. *Science* 311: 990-992. [107]
- Palmberg C. 1987. Conservation des ressources génétiques d'essences de bois. Document présenté au symposium sur la sylviculture et l'amélioration génétique. CIEF, Buenos Aires. Avril 1987. FAO, Département des forêts. [108]
- Papageorgiou A.C., Bergmann F., Gillet E., Hattemer H. H. 1993. Genetic analysis of isoenzyme variation in Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Silvae Genetica* 42: 109-111. [109]
- Papageorgiou A.C., Panetsos K. P., Hattemer H. H. 1994. Genetic differentiation of natural Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.) populations in Greece. *Forest Genetics* 1: 1-12. [110]
- Parker T., Donoso C. 1993. Natural regeneration of *Fitzroya cupressoides* in Chile and Argentina. *Forest Ecology and Management* 59: 63-85. [111]
- Paun O., Stuessy T. F., Hörandl E. 2006. The role of hybridization, polyploidization and glaciation in the origin and evolution of the apomictic *Ranunculus cassubicus* complex. *New Phytologist* 171: 223-236. [112]
- Petersen K. K., Hagberg P., Kristiansen K. 2003. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 137-146. [113]
- Petit R., Hamper A. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 187-214. [114]
- Picard E., Crambes E., Mihamou-Ziyyat A. 1994. L'haplodiploïdisation : un outil multi-usage pour la génétique et l'amélioration des céréales. Quel avenir pour l'amélioration

des plantes ? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris, pp. 355-369. [115]

Pichot C. 1997. Le cyprès de l'Atlas – Ressources génétiques. Actes du séminaire sur l'Amélioration, la Conservation et l'Utilisation des Ressources Génétiques Forestières Marocaines. *Annals de la Recherche Forestières au Maroc*, 144-154. [116]

Pichot C., El Maâtaoui M. 1997. Flow cytometric evidence for multiple ploidy levels in the endosperm of some gymnosperm species. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 865-870. [117]

Pichot C., El Maâtaoui M. 2000. Unreduced diploid nuclei in *Cupressus dupreziana* A. Camus pollen. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 574-579. [118]

Pichot C., Borrut A., El Maâtaoui M. 1998. Unexpected DNA content in the endosperm of *Cupressus dupreziana* A. Camus seeds and its implications in the reproductive process. *Sexual Plant Reproduction* 11: 148-152. [119]

Pichot C., Fady B., Hochu I. 2000. Lack of mother tree alleles in zymograms of *Cupressus dupreziana* A. Camus embryos. *Annals of Forest Science* 57: 17-22. [120]

Pichot C., El Maâtaoui M., Raddi S., Raddi P. 2001. Surrogate mother for endangered *Cupressus*. *Nature* 412: 39. [121]

Pichot C., Liens B., Rivera Nava J. L., Bachelier J. B., El Maâtaoui M. 2008. Cypress surrogate mother produces haploid progeny from alien pollen. *Genetics* 178: 379-383. [122]

Pillai S. K. 1963. Structure and seasonal study of the shoot apex of some *Cupressus* species. *New Phytologist* 62: 335–341. [123]

Quézel P. 1965. *La végétation du Sahara, du Tchad à la Mauritanie*. Ed. G.F.Verlag, Paris. [124]

Quezel P. 1978. Analysis of the Flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 479-534. [125]

R Development Core Team 2006. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [126]

Raddi P., Panconesi A. 1989. Genetic variability of tolerance to cold in *Cupressus sempervirens* progenies. *Silvae Genetica* 38(5-6):168-172. [127]

Ragot M., Steen P. 1992. Genetic and environmental effects on chromosome doubling of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) haploids. *Euphytica* 63: 233-237. [128]

Ramdani M., Rached O., Lograda T., Aggoun A. 2007. Genetic Diversity in Foliar Terpenoids Among Natural Populations of *Cupressus dupreziana* in Tassili n`Ajjer (Algeria). *Asian Journal of Plant Sciences* 6: 1211-1216. [129]

Raven D. P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E. 2000. *Biologie Végétale*. De Boeck Université. 968 p. [130]

Redha A., Attia T., Büter B., Saisingtong S., Stamp P., Schmid J. E. 1998. Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Reports* 17: 974-979. [131]

Richards A. J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences 358: 1085-1093. [132]

Rivera Nava J. L., Buonamici A., Vendramin G. G., Pichot C. Molecular evidence for natural production of homozygous *Cupressus sempervirens* L. lines by *Cupressus dupreziana* A. Camus seed trees. Soumis à la revue Heredity. [133]

Rosignol M., Maley J. 1969. L'activité hors de France des palynologues et paléobotanistes français du Quaternaire. In : Etudes françaises sur le Quaternaire. Brionne : Imprimerie Amelot, 1969, p. 265-274. Congrès International de l'INQUA, Paris. [134]

Rouanne P. 1973. Etude comparée de la répartition des ramifications au cours de l'ontogenèse de quelques Cupressacées. Thèse de Doctorat : Laboratoire Forestier de Toulouse. 277 p. [135]

Rushforth K., Adams R. P., Zhong M., Ma X. Q., Pandley R. N. 2003. Variation among *Cupressus* species from the eastern hemisphere based on Random Amplified Polymorphic dans (RAPDs). Biochemical Systematics and Ecology 31: 17-24. [136]

Saradhuldhat P., Silayoi B. 2001. Some chemical treatments on kluai khai through tissue culture for mutation breeding. Kasetsart Journal (Natural Sciences) 35: 231-241. [137]

Schnell R. 1976. Introduction à la phytogéographie des pays tropicaux. Vol. 3 : La flore et la végétation de l'Afrique tropicale. Gauthiers-Villars, Paris. [138]

Sebastiani F., Buonamici A., Fineschi S., Racchi M. L., Raddi P., Vendramin G. G. 2005. Novel polymorphic nuclear microsatellites in *Cupressus sempervirens* L. Molecular Ecology Notes 5: 393-394. [139]

Silba J. 1981. Revision of *Cupressus* L. (*Cupressaceae*). Phytologia 49: 390-399. [140]

Siller S. 2001. Sexual selection and the maintenance of sex. Nature 411: 689-692. [141]

Simonneau P., Debazac E. F. 1961. Le Cypres des Ajjers. Revue Forestière Française 2: 90-97. [142]

Sing H. 1978. Embryology of gymnosperms. Gebrüder Bomtraeger-Berlin, 302 p. [143]

Stankova T., Stankov H., Panetsos K. 1999. Seasonality in the primary growth of *Cupressus sempervirens* L. from western Crete. Silvae Genetica 48: 53-61. [144]

Stern K., Roche L. 1974. Genetics of forest ecosystems. Springer Verlag-Berlin. [145]

Stewart P. J. 1969. *Cupressus dupreziana*, threatened conifer of the Sahara. Biological Conservation 2: 10-12. [146]

Stewart P. J. 1976. *Cupressus dupreziana*. In : Fiches de renseignements sur les essences dont le patrimoine génétique s'appauvrit. Bulletin des Ressources Génétiques Forestières - Numéro 5, 42 p. [147]

Stewart P. J. 1981. *Cupressus atlantica*. In: FAO Forestry Department (compiler). Databook on endangered tree and shrub species and their provenances. Rome: FAO. [148]

Sumer S. 1987. The Distribution of Cypress (*Cupressus* L.) In: Turkey and the current status in its pests and diseases, especially cypress canker disease. Istanbul Universities Orman

Fakultesi Dergisi. Seri a 37: 46-66. [149]

Thinon M., Ballouche A., Reille M. 1996. Holocene vegetation of the Central Saharan Mountains: the end of a myth. *The Holocene* 6: 457-462. [150]

Tinti F., Scali V. 1995. Allozymic and cytological evidence for hemiclinal, all-paternal, and mosaic offspring of the hybridogenetic stick insects *Bacillus rossiusgrandii grandii*. *Journal of Experimental Zoology* 273: 149-159. [151]

Tosca A., Pandolfi R., Citterio S., Fasoli A., Sgorbati S. 1995. Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of *Gerbera*. *Plant Cell Reports* 14: 455-458. [152]

Tucovic A. 1956. Cempres - *Cupressus sempervirens* L. u Beogradu. *Sumarstvo* 1-2: 45-52. [153]

Valen L. V. 1975. Group selection, sex, and fossils. *Evolution* 29: 87-94. [154]

Van Dijk P., van Damme J. 2000. Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends in Plant Science* 5: 81-4. [155]

Vendramin G. G., Fady B., Gonzalez-Martinez S. C., Hu F. S., Scotti I., Sebastiani F., Soto A., Petit R. J. 2008. Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic mediterranean pine. *Evolution* 62: 680-688. [156]

Vidakovic M. 1991. Conifers: morphology and variation. Translated from Croatian by Maja Soljan. Croatia: Graficki Zavod Hrvatske. [157]

Vielle-Calzada J. P., Crane C. F., Stelly D. M. 1996. Apomixis. The asexual revolution. *Science* 274: 1322-1323. [158]

Walters J., Soos J. 1963. Shoot growth patterns of some British Columbia conifers. *Forest Science* 9: 73-83. [159]

Wan Y., Petolino J. F., Widholm J. M. 1989. Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 889-892. [160]

Wan Y., Duncan D. R., Rayburn A. L., Petolino J. F., Widholm J. M. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 205-211. [161]

WCMC. 1999. World Conservation Monitoring Centre - Trees database. <http://www.wcmc.org.uk/cgi-bin/SaCGI.cgi/trees.exe>. [162]

Yani A., Baradat P., Bernard-Dagan C. 1990. Chemotaxonomy of *Cupressus* species. In: *Progress in EEC research on cypress diseases*. J. Ponchet Ed. Luxembourg: Commission of the European Communities, 29-38. [163]

Zhang Y. X., Lespinasse Y., Chevreau E. 1990. Induction of haploidy in fruit trees. *Acta Horticulturae* 280 : 293-305. [164]

Zobel D. B. 1983. Twig elongation patterns of *Chamaecyparis lawsoniana*. *Botanical Gazette* 144: 92-103. [165]

LE MATÉRIEL VÉGÉTAL

Annexe 1

NOM	NOMBRE	TYPE MATÉRIEL VÉGÉTAL	ORIGINE	HAUT. OU DIAMÈTRE	FRUCTIFICATION	COMMENTAIRE	LIEU DE PLANTATION	ORIGINE DE L'INFO
1S*DUP	4	demi-frères	Le Ruscas			Pollen sempervirens	Cadarache (4)	URFM
36S*DUP	44	demi-frères	Le Ruscas			Pollen sempervirens	Cadarache (44)	URFM
14S*DUP	18	demi-frères	Le Ruscas			Pollen sempervirens	Cadarache (18)	URFM
22S*DUP	18	demi-frères	Le Ruscas			Pollen sempervirens	Cadarache (18)	
A59.971	3		Tassili			Récolté par Laferrere	Villa Thuret (2), Eze (1),	INRA Antibes
A67.787	5		Tassili			Graines reçues de la faculté d'Alger	Saint Honorat (5)	INRA Antibes
A.79.773	7	demi-frères					Tassili (7)	URFM
A.80.32	20	demi-frères					Tassili (20)	URFM
A.80.33	22	demi-frères					Tassili (22)	URFM
A.79.4	50	demi-frères					Tassili (50)	URFM
A.73.774	10	demi-frères					Tassili (10)	URFM
A.79.772	7	demi-frères					Tassili (7)	URFM
DUPR 1	9	clone	A59.971 (Villa Thuret)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	URFM
DUPR 2	9	clone	A59.971 (Villa Thuret)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 3	9	clone	A59.971 (Eze)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 4	9	clone	A67.787 (Saint Honorat)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 5	9	clone	A67.787 (Saint Honorat)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 6	9	clone	A67.787 (Saint Honorat)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 7	9	clone	A67.787 (Saint Honorat)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 8	9	clone	A67.787 (Saint Honorat)				Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 9	9	clone	66.895-FAO-Tunis, 73.323-AFOCEL			Rameaux fournis par la faculté de Toulouse au service forestier de Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 10	9	clone	66.896-FAO-Tunis, 73.324-AFOCEL			Rameaux obtenus par le service forestier de Tunis, probablement de la faculté de Toulouse	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 11	9	clone	67.125-FAO-Tunis, 73.325-AFOCEL			Rameaux prélevés sur des plants de semis obtenus à Alger. Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM

DUPR 12	9	clone	67.126-FAO-Tunis, 73.326-AFOCEL				Rameaux prélevés sur des plants de semis obtenus à Alger. Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4), les Barres ?	INRA Antibes, URFM
DUPR 13	9	clone	67.127-FAO-Tunis, 73.327-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 14	9	clone	67.128-FAO-Tunis, 73.328-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 15	9	clone	67.129-FAO-Tunis, 73.329-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 16	9	clone	67.130-FAO-Tunis, 73.330-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 17	9	clone	67.131-FAO-Tunis, 73.331-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 18	9	clone	67.132-FAO-Tunis, 73.332-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 19	9	clone	67.133-FAO-Tunis, 73.333-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 20	9	clone	67.134-FAO-Tunis, 73.334-AFOCEL				Rameaux prélevés à Alger sur des plants de semis (graines du Tassili). Greffés à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 21	9	clone	68.131-FAO-Tunis, 73.335-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 22	9	clone	68.132-FAO-Tunis, 73.336-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 23	9	clone	68.133-FAO-Tunis, 73.337-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 24	9	clone	68.134-FAO-Tunis, 73.338-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 25	9	clone	68.135-FAO-Tunis, 73.339-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM

DUPR 26	9	clone	68.136-FAO-Tunis, 73.340-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 27	9	clone	68.137-FAO-Tunis, 73.341-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 28	13	clone	68.138-FAO-Tunis, 73.342-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (8)	INRA Antibes, URFM
DUPR 29	13	clone	68.139-FAO-Tunis, 73.343-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (8)	INRA Antibes, URFM
DUPR 30	11	clone	68.140-FAO-Tunis, 73.344-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (6)	INRA Antibes, URFM
DUPR 31	29	clone	68.141-FAO-Tunis, 73.345-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (24)	INRA Antibes, URFM
DUPR 32	16	clone	68.142-FAO-Tunis, 73.346-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (11)	INRA Antibes, URFM
DUPR 33	33	clone	68.143-FAO-Tunis, 73.347-AFOCEL, Hoggar				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ruscas (3), Ravin des Caunes (4), Carpentras(21)	INRA Antibes, URFM, Pépinières Rey
DUPR 34	9	clone	68.144-FAO-Tunis, 73.348-AFOCEL				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 35	41	clone	68.145-FAO-Tunis, 73.349-AFOCEL, Tamrit				Tassili des Ajjer ? Sahara Central. Greffage à Tunis	Tassili (5), Ruscas (3), Ravin des Caunes (4), Carpentras(29)	INRA Antibes,URFM, Pépinières Rey
DUPR 36	9	clone	Villa lesCèdres				Plant issu de graines récoltées sur descendance du Tassili et cultivé au Liban	Tassili (5), Ravin des Caunes (4)	INRA Antibes, URFM
DUPR 37	21	clone						Tassili(5), Ravin des Caunes(16)	INRA Antibes, URFM
DUPR 38	10	clone						Ravin des Caunes (10)	INRA Antibes, URFM
AUR	148						Codes à préciser par l'URFM et effectif par clone à intégrer aux lignes précédentes	Aurons (148)	URFM
PIGN	47					Oui	Collection AFOCEL (effectif par clone à intégrer aux lignes précédentes)	Pignan (47)	URFM
MON	7	demi-frères	Tassili			Oui	Issus de semis de graines récoltées par Mme Perrière sur UN arbre dans la vallée au dessus de Djanet	Jardin des Plantes de Montpellier (7) : MON	Riou, URFM

ADB	2								Arboretum des Barres à Noget sur Vernisson : Les Barres (2)	Thierry Lamant, ONF
CAN	2		Ruscas pour un plant					Le plus âgé a été enregistré aux Barres	Cantal : CAN (2)	Thierry Lamant, ONF
ACHM	1		Pépinière Aix-Les-Milles						Arboretum du centre héliomarin (Vallauris) (Alpes-Maritimes), ACHM (1)	Thierry Lamant, ONF
SBS	1								St Barthélémy de Séchillienne (Isère), SBS (1)	Thierry Lamant, ONF
ADH	1								Arboretum d'Harcourt ADH (1)	Thierry Lamant, ONF
PTO	3		greffons et boutures du Liban		1 porte des cônes			Les 3 spécimens ont été greffés sur <i>C. arizonica</i>	Parc de la tête d'Or à Lyon : PTO (3)	Thierry Lamant, ONF
SCMO	1								St Cyr au Mont d'Or : SCMO (1)	Thierry Lamant, ONF
BF	1								Bambouiserie Prafrance à Anduze (Gard), BF (1)	Thierry Lamant, ONF
AVIG	1								près gare SNCF d'Avignon : AVIG (1)	URFM
VILL	1								Villevières : VILL (1)	Thierry Lamant, ONF
VDC	9		Tassili			Mars 1970: 3,55m et 2,83m		récoltés en 1960 par M. Lafferrière	Villa des Cèdres St Jean Cap Ferrat : VDC (9)	Thierry Lamant, ONF
VT	3		graines récoltées			en 1970 2 à 3 m		récoltés en 1960 par M. Lafferrière (à fusionner avec A59.971 et A67.787 ?)	Villa Thuret (3)	Thierry Lamant, ONF
MENT	1								Val Rameh Menton : MEN (1)	Thierry Lamant, ONF
DOUR	1								Dourdan (1)	Thierry Lamant, ONF
TDS	1								Tour de Salvigny TDS (1)	Thierry Lamant, ONF
MONT	40							Codes à préciser par l'URFM	Hôpital Montfavet (40)	URFM
GROZ	75							Codes à préciser par l'URFM	Grozeau Mallaucène (75)	URFM
Cd Est	1		demi-frères						Ruscas	URFM
Cd Ouest	1		demi-frères						Ruscas	URFM
AUR	148							Codes à préciser par l'URFM	Aurons (148)	URFM

ADV	10								Arboretum de Villardebelle (10)	D. Maerki
Mon1	1	demi-frères	Jardin des Plantes de Montpellier (MON)				Code 7-32		Arboretum de Villardebelle (1)	D. Maerki, URFM
Mon2	2	demi-frères	Jardin des Plantes de Montpellier (MON)				Codes 6-31 et 6-32		Arboretum de Villardebelle (2)	D. Maerki, URFM
Mon4	2	demi-frères	Jardin des Plantes de Montpellier (MON)				Codes 4-17 et 8-26		Arboretum de Villardebelle (2)	D. Maerki, URFM
Cd estDesc	2	demi-frères	descend. de Cd est				Codes 7-22 et 7-23		Arboretum de Villardebelle (2)	D. Maerki, URFM
CAR 50/46	3	demi-frères	descend. CAR 50/46				Codes 6-24, 8-21 et 8-35		Arboretum de Villardebelle (3)	D. Maerki, URFM
ROQ	3			10 m					Roquevaire ROQ (3)	
SEN	1		Villa Thuret				il a été planté en 1969 dans le Jardin du Musée Saharien		Abbate de Sénanque : SEN (1)	Publication Barry et al. 1970
LBTa	2		Tassili				1 et 2 : proviennent des récoltes de Leredde en 1949		Laboratoire de Botanique de Toulouse : LBT (2)	Publication Barry et al. 1970
LBTb	6		Tassili				3 à 8 : graines récoltées par le Pr Barry en 1966		Laboratoire de Botanique de Toulouse : LBT (6)	Publication Barry et al. 1970
JOT	1		Tassili				Provient de la 2nde récolte de Leredde en 1952		Jardin de l'Observatoire à Toulouse : JOT (1)	Publication Barry et al. 1970
TOU	1						Provient de la 2nde récolte de Leredde en 1952		Jardin de M. Camichel à Toulouse : CAM (1)	Publication Barry et al. 1970
EYZ	1								Jardin de M. Monjauze à Eyzin-Pinet : EYZ (1)	Publication Barry et al. 1970
ORS	1								Institut Botanique de la faculté des Sciences : ORS (1)	Publication Barry et al. 1970
QUE	1		Tassili				graines récoltées à Tamrit en 1953 par Leredde et semées en 1961 à Toulouse		Jardin de M. Favier à Quettehou : QUE (1)	

LIEU OÙ EST PLANTÉ LE MATÉRIEL

Annexe 2

COORD. GÉOGRAPHIQUES																	
CODE	NOM	SURFACE (ha)	LAT.	LONG.	ALT. (m)	PLUV. (mm/an)	SUBSTRAT	MAT. VÉGÉTAL	GESTIONNAIRE	DATE DE PLANTATION	NBRE ARBRES	LIEU DE PLANTATION	EXPOSITION	COMMENTAIRE	PROPRIÉTAIRE	CONFID. ENT.	ORIGINE DE L'INFO
0357100001	Cadarache	0.2556	43.713	5.757	290	630	Alluvions de la Durance	1S*DUP 36S*DUP 14S*DUP 22S*DUP	INRA	janv.-87	84	F.D. De Cadarache (Bouches-du-Rhône)	plat- 0%		Commune	non	URFM
0657040001	le Tassill	0.5	43.497	6.864			Schistes	A.79.773, A.80.32, A.80.33, A.79.4 A.73.774, A.79.772 de DUPR 1 a DUPR 35 et DUP 38		hiver 1980- 1981	301	Estérel		INRA	non	URFM	
0657040002	Ravin des Caunes	0.3	43.19	6.38				de DUPR 1 à DUPR 38		15-mars-95	207	Ravin des Caunes – Ruscas (Bormes Les Mimosas)		Copie du Tassill (Estérel)		non	URFM
	Carpentras	1 arbre ts les 0,75m	44,06	5,05				DUPR 35 = Tamit (29), DUPR 33 = Hoggar (21)			50	Pépinières Rey Carpentras			Pépinières Rey		URFM
	Montpellier		43,61	3,88				MON (7 arbres)		31-janv.-00	7	Jardin Botanique de Montpellier			Commune	non	URFM
	Pignan		43.588	3.719					AFOCEL		47 (à confirmer)	Pignan (Hérault)			M. Cazal		URFM
	Barres									pour 1 des des 2, vers 1985 ?	2	Arboretum des Barres					Thierry Lamant, ONF

Montfavet	43.92	4,88								40	Hôpital de Montfavet (Vaucluse)				URFM
Grozeau	44.17	5,15								75	Grozeau Mallaucène (Vaucluse)	département			URFM
Ruscas										2	Ruscas (Var)				URFM
Aurons	43.665	5.157	310							148 (à confirmer)	Aurons (Bouches-du-Rhône)				URFM
Arboretum de Villardebelle	43.02	2,38								20	Arboretum de Villardebelle (Aude)				D. Maerki
Roquevaire	43.35	5,6								3	Roquevaire (Bouches-du-Rhône)				Quezel
Sénanque	43.928	5.186								1	Abbaye de Sénanque Jardin du musée Saharien (Vaucluse)				Publication Barry et al. 1970
L.B. Toulouse	43.6	1.433								8	Laboratoire de Botanique de Toulouse (Haute Garonne)				Publication Barry et al. 1970
J.O. Toulouse	43.6	1.433								1	Jardin de l'Observatoire à Toulouse (H Garonne)				Publication Barry et al. 1970
Toulouse	43.6	1.433								1	Jardin d'un particulier à Toulouse (Haute Garonne)			M. Camichel	Publication Barry et al. 1970
Eyzin-Pinet	45.466	4.983	350							1	Jardin d'un particulier à Eyzin-Pinet (Isère)				Publication Barry et al. 1970
Orsay	48.7	48.7								1	Institut Botanique de la faculté des Sciences à Orsay (Essonne)				Publication Barry et al. 1970
Quettehou	49.6	-1.3								1	Jardin d'un particulier à Quettehou (Manche)			M. Favier	Publication Barry et al. 1970