



**HAL**  
open science

**Déterminants de la variation moléculaire et  
phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire:  
cas de Santalum austrocaledonicum en Nouvelle  
Calédonie**

Lorraine Bottin

► **To cite this version:**

Lorraine Bottin. Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique d'une espèce forestière en milieu insulaire: cas de Santalum austrocaledonicum en Nouvelle Calédonie. Ecologie, Environnement. Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier - AGRO M, 2006. Français. NNT: . tel-00097974

**HAL Id: tel-00097974**

**<https://theses.hal.science/tel-00097974>**

Submitted on 22 Sep 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER  
AGRO MONTPELLIER**

T H E S E

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER**

Discipline : Biologie des Populations et Ecologie  
Formation Doctorale : Biologie des Populations et Ecologie.  
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

présentée et soutenue publiquement

par

**Lorraine BOTTIN**

Le 27 février 2006

**Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique  
d'une espèce forestière en milieu insulaire : cas de  
*Santalum austrocaledonicum* en Nouvelle-Calédonie**

Devant le jury composé de :

JM BOUVET	Chercheur, CIRAD, Montpellier	Co-directeur de thèse
N FRASCARIA-LACOSTE	Maître de Conférence, Univ. Paris XI	Rapporteur
J-C GLASZMANN	Chercheur, CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse
D McKEY	Professeur, Univ. Montpellier 2	Examineur
M-L NAVAS	Professeur ENSAM, Montpellier	Examinatrice
I TILL-BOTTRAUD	Directrice de Recherches, CNRS, Grenoble	Rapporteur





**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER  
AGRO MONTPELLIER**

**T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE DE MONTPELLIER**

Discipline : Biologie des Populations et Ecologie  
Formation Doctorale : Biologie des Populations et Ecologie.  
Ecole Doctorale : Biologie Intégrative

présentée et soutenue publiquement

par

**Lorraine BOTTIN**

Le 27 février 2006

**Déterminants de la variation moléculaire et phénotypique  
d'une espèce forestière en milieu insulaire : cas de *Santalum  
austrocaledonicum* en Nouvelle-Calédonie**

Devant le jury composé de :

JM BOUVET	Chercheur, CIRAD, Montpellier	Co-directeur de thèse
N FRASCARIA-LACOSTE	Maître de Conférence, Univ. Paris XI	Rapporteur
J-C GLASZMANN	Chercheur, CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse
D McKEY	Professeur, Univ. Montpellier 2	Examineur
M-L NAVAS	Professeur ENSAM, Montpellier	Examinatrice
I TILL-BOTTRAUD	Directrice de Recherches, CNRS, Grenoble	Rapporteur



## Remerciements

Un très grand merci à Jean-Marc Bouvet pour m'avoir permis de travailler à ses côtés, m'avoir guidée et conseillée durant mon travail de thèse.

Merci aussi à Jean-Christophe Glaszmann pour avoir accepté de diriger ma thèse et m'avoir suivie durant ces trois années, ainsi que tous les membres du jury pour avoir eu l'amabilité d'évaluer mon travail.

Merci à tous les membres de l'équipe de Génétique Forestière du CIRAD, en particulier Alexandre Vaillant pour son précieux travail de laboratoire, Mireille Poitel pour ses conseils et sa bonne humeur, Roselyne Lannes, Frédéric Mortier, ainsi que Daniel Verhaegen, Jean-Marc Gion, Gilles Chaix et Olivier Monteuuis.

Merci également à la direction du CIRAD forêt, en particulier Jacques Valeix, Bernard Mallet, Eric Loffeier et Christian Sales et à la direction scientifique du CIRAD pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions matérielles et financières.

Merci à Isabelle Olivieri de m'avoir soutenue et aidée de nombreuses fois au cours de ma thèse tant sur le plan théorique que moral. Merci aux autres membres de mon comité de thèse : Frédéric Austerlitz, Frédéric Hospital et Claire Billot.

Un grand merci à toutes les personnes sur le terrain, à l'autre bout du globe, en Nouvelle-Calédonie, qui nous ont permis de mener à bien cette aventure, en particulier à Thierry Mennesson, directeur de l'IAC, Jacques Tassin pour ses précieux conseils, sa connaissance du terrain et sa gentillesse, et Alexandre Lagrange pour son aide, son formidable travail sur le terrain, et pour m'avoir fait découvrir ce bel archipel. Merci à Géraldine Derroire, aujourd'hui chargée des récoltes, Martin Brinkert et Florian Steierer qui ont effectué un important travail d'inventaire, Jean-Paul Chauvin pour les plantations, ainsi que Robert Nasi et Yves Erhart pour leur importante contribution aux tous débuts sans lesquels l'étude du Santal calédonien n'aurait jamais vu le jour. Merci à toutes les personnes ayant participé aux récoltes en Calédonie, aux chefs des provinces qui nous ont accordé le droit d'y effectuer le travail de terrain, et aux propriétaires de Santal pour nous avoir permis d'échantillonner leur(s) arbre(s). Merci à M. Isnard de l'entreprise Cosmécal, pour m'avoir fait partager son savoir sur les huiles essentielles ainsi qu'à son épouse, leurs employées ainsi que Colin Godefroy pour les analyses chimiques.

Merci à toutes les personnes du « Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles » de Tahiti pour leur accueil chaleureux et leur aide, tout particulièrement à Phila Raharivelomanana et Jean-Pierre Bianchini, ainsi qu'à Jean-François Butaud qui a réalisé un travail colossal sur le Santal polynésien et m'a beaucoup appris.

Merci à tous les stagiaires de la « Sandalwood team » : Pierre, Annabelle, Aurore, Fanny, et tout dernièrement Emeline, sans oublier tous les autres thésards et stagiaires du CIRAD forêt que j'ai pu côtoyer durant ces trois années, en particulier Nicolas, Mickaël, Félix et Inza.

Je remercie aussi en particulier mes amis les plus chers : Sophie, Thomas, Frédéric, et Cédric.

Un très grand et tout spécial merci à Pascal!

Enfin merci à mes grands-parents, à Manon, et à mes parents, à qui je dois tout.



## TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements</b>	<b>2</b>
<b>Table des matières</b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>8</b>
<b>Chapitre 1. Matériel biologique : le Santal de Nouvelle-Calédonie</b>	<b>15</b>
1.1. Taxonomie et répartition des espèces de Santal	16
I.2. Le milieu naturel de <i>Santalum austrocaledonicum</i> : la Nouvelle-Calédonie	17
1.2.1. Géographie physique	17
1.2.2. Sols	19
1.2.3. Climat	20
1.2.4. Précipitations et humidité	20
1.2.5. Végétation	20
1.3. Caractéristiques biologiques et écologiques de <i>Santalum austrocaledonicum</i>	22
1.3.1. Caractéristiques botaniques	22
1.3.2. Hémiparasitisme	23
1.3.3. Croissance	24
1.3.4. Reproduction	25
1.3.5. Bois	26
1.3.6. Dynamique des populations, écologie	27
1.4. Le bois de Santal, un parfum très prisé	28
1.4.1. Pourquoi un tel engouement pour ce produit ?	28
1.4.2. L'exploitation en Nouvelle-Calédonie.	29
1.4.3. Répartition et potentiel d'exploitation	30
1.5. Méthode d'échantillonnage	32
Conclusion	32



## **Chapitre 2. Diversité et structure génétiques sur la base de marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques** **33**

2.1. Quels sont les attendus sur la diversité génétique de <i>Santalum austrocaledonicum</i> en Nouvelle-Calédonie ?	35
2.2. Le choix des marqueurs microsatellites	36
2.3. Matériel et méthodes d'analyse des microsatellites chloroplastiques et nucléaires	38
2.4. Sélection des individus analysés	39
2.5. Les paramètres de génétique des populations	40
2.5.1. Paramètres usuels de description de la diversité génétique.	40
2.5.2. F-statistiques	41
2.5.3. Test de Mantel	42
2.5.4. Construction arborée	42
2.5.5. Test d'un goulot démographique	43
2.5.6. Comparaison des flux de pollen et de graines	43
2.6. Une diversité et une structuration génétiques des îles complexes partiellement conformes aux attendus en milieu insulaire	44
2.6.1. Diversité génétique au sein de l'archipel	44
2.6.2. Différenciation génétique au sein de l'archipel	45
2.6.3. Comparaison des espèces insulaires et continentales	47
2.6.4. Comparaison des flux par graine et par pollen	47
2.7. Une structuration génétique faible intra-population (sur Grande Terre), et intra-île (pour les autres îles)	48
2.8. Un déficit en hétérozygotes sur certaines îles	49
2.9. Un scénario de colonisation dans l'archipel et une expansion récente	52
2.10. Aspect démographique : une expansion récente	53
Conclusion	54

## **Chapitre 3. Etude de la variation de caractères à valeur adaptative** **55**

3.1. Echantillonnage des graines et des feuilles juvéniles	56
3.2. Méthode d'analyse de la variabilité	58
3.3. Des résultats montrant une nette différenciation entre provenances	60
3.4. Pourquoi une telle variabilité ?	62
Conclusion	66





<b>Chapitre 4. Analyse de la variabilité chimique des huiles essentielles</b>	<b>68</b>
4.1. Introduction	69
4.1.1. Les composés secondaires des plantes	69
4.1.1.1. Un moteur évolutif longtemps dénigré	69
4.1.1.2. Un rôle défensif coûteux – hypothèses évolutives	70
4.1.1.3. Impact des facteurs environnementaux et génétiques sur la variabilité des composés secondaires	72
4.1.2. Les composés secondaires du Santal : localisation et rôle	73
4.1.3. Objectifs de l'étude	77
4.2. Echantillonnage de bois de cœur, analyses chimiques et statistiques	78
4.2.1. Echantillonnage	78
4.2.1.1. Plan d'échantillonnage	78
4.2.1.2. Méthode de recueil des échantillons	78
4.2.2. Analyses chimiques du bois de cœur	79
4.2.2.1. Extraction des échantillons	79
4.2.2.2. Injection et analyse des échantillons	80
4.2.2.3. Interprétation des chromatogrammes.	80
4.2.2.4. Les variables analysées	81
4.2.3. Méthode d'analyse statistique	82
4.2.3.1. Description de la variabilité sur l'ensemble de la Calédonie	82
4.2.3.2. Variation inter-population par approche multivariée	82
4.2.3.3. Analyse de variance à effets fixes et comparaison de moyennes pour les molécules principales	83
4.2.3.4. Variation inter et intra-population par modèle à effets aléatoires	83
4.2.3.5. Variation intra-population : approche multivariée	83
4.2.3.6. Analyse de différents facteurs explicatifs de la variabilité	84
4.2.3.6.1. Hauteur et diamètre des arbres.	84
4.2.3.6.2. Facteurs abiotiques	84
4.2.3.6.3. Analyse combinée des marqueurs chimiques et des marqueurs microsatellites	85
4.3. Résultats	86
4.3.1. Description de la variabilité sur l'ensemble de la Nouvelle-Calédonie	86
4.3.2. Variation inter et intra-population	87
4.3.2.1. Approche multivariée	87



4.3.2.2. Comparaison des populations pour les molécules les plus présentes (modèle d'ANOVA à effets fixes)	89
4.3.3. Variation inter et intra-population par modèle à effets aléatoires	89
4.3.4. Distribution spatiale intra-population : approche multivariée	90
4.3.5. Relation avec la variable biologique « taille de l'arbre » et avec les variables abiotiques.	90
4.3.6. Relation avec la variabilité moléculaire.	90
4.4. Discussion	92
4.4.1. Caractéristiques de la concrète calédonienne, et explication des pics	92
4.4.2. Caractérisation chimique des populations	93
4.4.3. Distribution de la variabilité entre et au sein des populations	95
4.4.4. Comment expliquer la variabilité chimique au sein de l'espèce ?	95
Conclusion	97

## **Chapitre 5. Approche méthodologique pour la conservation et la gestion de *Santalum austrocaledonicum***

Pourquoi conserver <i>Santalum austrocaledonicum</i> ?	100
Génétique de la conservation et définition d'Unités Evolutives Significatives	100
Vers une stratégie de gestion du Santal calédonien	103

### **Conclusion et perspectives**

L'évolution en milieu insulaire dans le cas de <i>Santalum austrocaledonicum</i>	107
Réponse aux objectifs et perspectives de recherche	109

### **Bibliographie**

### **Annexes**

- **Annexe 1** : Localisation de l'échantillonnage en Nouvelle-Calédonie.
- **Annexe 2** : Recherche d'activité antitermite et antifongique des extraits du Santal.



- **Annexe 3 :** Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A, Bouvet JM (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular Ecology*, 14 (7), 1979-1989.
- **Annexe 4 :** Bottin L, Vaillant A, Sire P, Cardi C, Bouvet J M (2005) “Isolation and Characterization of microsatellite loci in *Santalum austrocaledonicum*, Santalaceae”, *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 800-802.
- **Annexe 5:** Bottin L, Tassin J, Nasi R, Bouvet JM. Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia. *Conservation Genetics*, sous presse.



# *Introduction*





*L'homme vertueux doit imiter l'arbre de Santal qui,  
lorsqu'on l'abat, parfume la hache qui le frappe  
[Proverbe indien]*

Les systèmes insulaires sont classiquement considérés comme de véritables « laboratoires naturels d'évolution », au sein desquels les patrons et les processus écosystémiques, généralement simplifiés dans ces communautés spatialement réduites, peuvent être abordés de manière optimale. Les recherches menées depuis plus de 150 ans sur ces systèmes ont permis des avancées fondamentales dans la connaissance des relations entre la géographie et les processus biologiques, en inspirant des scientifiques tels que Darwin, Wallace, Mayr, Wilson et Diamond. Parmi les îles les plus étudiées, Maurice, Hawaï, les Galapagos, et la Nouvelle Zélande sont devenues des références en terme d'études biologiques en milieu insulaire.

De nos jours, les systèmes insulaires constituent toujours une cible privilégiée pour les recherches en biologie de l'évolution, comme en témoigne la littérature récente. Ainsi, par exemple l'étude de Gillespie (2002) permet d'aborder le phénomène de convergence adaptative par l'étude du genre d'araignées Tetragnatha sur trois îles polynésiennes ; Holzapfel *et al.* (2002) pose la question de la gestion des espèces rare selon qu'elles sont issues de populations naturellement petites ou anciennement fragmentées ; enfin Clarke (2002) utilise une matrice d'habitats répartis en patchs et montre l'existence d'une réponse évolutive des plantes à la fréquence et l'intensité des feux via leurs stratégies d'histoire de vie (Drake, 2002).

La définition d' « île » ne se limite pas aux îles insulaires, elle inclut aussi les îles continentales qui sont des patchs d'habitats isolés dans une matrice environnementale contrastante, leur isolement pouvant être naturel (ex : Mont Kilimandjaro, Lac Baïkal) ou anthropogénique, par la fragmentation d'un milieu anciennement continu (ex : construction d'infrastructures, agriculture) (Drake, 2002).

Au-delà de ce qualificatif commun d' « îles », ces systèmes possèdent chacun des particularités uniques, notamment en ce qui concerne leur degré d'isolement (distance par rapport au continent pour les îles insulaires), leur âge (ex : île issue du continent ou volcanique), leur biotope (altitude, sol, climat) et leur biocénose (faible nombre d'espèces, et présence d'espèces endémiques). Ainsi, certaines études désirant généraliser la théorie insulaire en considérant les îles comme étant fonctionnellement semblables (Simberloff,



1982) se sont révélées peu probantes, et ont montré qu'il était préférable de considérer les systèmes insulaires au cas par cas (Lomolino, 2000 ; Watson, 2002).

De par leurs spécificités écosystémiques et géographiques, les îles océaniques présentent des forces évolutives différentes entre îles mais surtout par rapport aux continents et ce d'autant plus que les îles sont éloignées du continent (Acker, 1996) :

- La dérive génétique, phénomène faisant référence aux fluctuations dues au hasard des fréquences alléliques d'une génération à la suivante, est d'autant plus importante que la population est de petite taille. En milieu insulaire, les populations sont souvent de faible taille, du fait de la surface géographique limitée offerte par ce milieu. Leur taille est tout particulièrement restreinte au moment de la colonisation, le nombre d'individus fondateurs étant généralement faible. Ces petites populations sont donc particulièrement soumises à l'effet de dérive génétique qui joue un rôle prédominant dans le façonnement leur diversité génétique. Lorsque les populations sont de taille plus grande et distribuées en continu, un autre facteur peut intervenir et créer de la dérive : la fragmentation d'origine anthropique, qui subdivise les populations en des entités de taille faible.

- Les mutations, changements dans la séquence de base de l'ADN, engendrent dans les petites populations isolées que sont les populations insulaires, une différenciation génétique par rapport aux autres populations de la même espèce. Ces mutations peuvent être bénéfiques du point de vue sélectif, ce qui favorise l'adaptation au milieu. Mais elles peuvent aussi être plus ou moins fortement délétères, pouvant alors entraîner, dans les petites populations, de la dépression de consanguinité.

- La migration est une force évolutive particulièrement importante dans les méta-populations. En effet, le niveau de différenciation génétique entre sous-populations dépend principalement du niveau de migration et des fréquences alléliques relatives dans les sous-populations donatrices et réceptrices. Pour des traits n'influençant pas la survie ou la reproduction comme les marqueurs neutres, les fréquences alléliques sont déterminées principalement par l'équilibre entre migration et dérive. En milieu insulaire, les distances entre îles peuvent être très importantes. Dans ces conditions, les événements de fondation et de migration (une fois les populations établies) sont assez rares. Pour les espèces végétales, qui sont non mobiles, la fondation (par les graines) et la migration (par les graines ou le pollen) se réalisent par



l'intermédiaire de vecteurs devant assurer une dissémination et/ou une dispersion à longue distance, autrement dit le vent ou certains insectes pour le pollen, et les courants marins, les oiseaux ou le vent pour les graines.

- La sélection naturelle, qui permet aux génotypes possédant un avantage sélectif d'avoir une plus forte contribution en terme de descendants à la génération suivante, joue de façon importante dans les systèmes insulaires. Ceux-ci présentent en effet des habitats écologiquement variés, pouvant même dévoiler des gradients environnementaux importants, par exemple dans les petites îles volcaniques où les dénivelés peuvent être très forts. Cette hétérogénéité environnementale engendre des pressions sélectives diverses souvent exacerbées par rapport aux milieux continentaux. Plus particulièrement chez les espèces forestières, les traits phénotypiques pouvant être soumis à la sélection sont nombreux. Parmi eux, ceux que nous allons présenter dans cette étude : un trait lié à la reproduction (la taille des graines), et des traits liés à la survie (la taille des feuilles de laquelle dépend la photosynthèse, et les composés secondaires responsables de la protection de l'arbre). D'autres particularités des îles agissent aussi comme pressions sélectives sur certains caractères. Notamment le manque de pollinisateurs, largement moins représentés dans les îles que sur les continents (Barrett, 1996), a engendré un nombre plus restreint de coadaptations entre fleurs et pollinisateurs, par exemple les fleurs de Nouvelle Zélande sont petites et généralement de forme simple alors que leurs homologues australiennes portent des couleurs plus chatoyantes et des formes plus complexes (Barrett, 1996).

Les espèces insulaires sont particulièrement soumises aux extinctions. Bien qu'elles ne représentent qu'une faible proportion des espèces mondiales, elles constituent la majorité des extinctions enregistrées depuis 1600 et des espèces listées comme menacées (Frankham *et al.*, 2002). Leur vulnérabilité est directement liée à la particularité des forces évolutives que nous venons de voir.

La dérive génétique engendre une perte de diversité génétique, or, comme souligné par Frankel (1983), les espèces doivent avoir un pool de diversité génétique disponible si elles veulent survivre aux pressions environnementales excédant leurs limites de plasticité phénotypique. Cette perte de diversité est accrue par un taux souvent important de consanguinité liée au faible nombre d'individus, pouvant atteindre un niveau correspondant - pour des populations captives - à une extinction (Hamrick, 2000, Savolainen *et al.*, 2000). La consanguinité est particulièrement importante chez les espèces à reproduction autogame. Or



ce mode de reproduction est très représenté chez les plantes insulaires car il représente une stratégie de multiplication efficace pour pallier au manque de pollinisateurs (Barrett, 1996). Une question majeure en matière d'évolution insulaire est celle de savoir quand l'autogamie est favorisée par rapport à l'allogamie en milieu insulaire. Bien qu'il n'y ait encore pas suffisamment de résultats à ce sujet, les études tendent à prouver que les plantes autogames seraient mieux adaptées aux milieux insulaires (Barrett, 1996).

La sélection naturelle opérant sur les îles peut aussi augmenter le risque d'extinction (Frankham, 1998). Les populations insulaires endémiques ont généralement existé sur les îles en petit effectif plus longtemps que les populations non-endémiques. Elles vivent isolées depuis si longtemps et dans des conditions tellement différentes de celles du continent d'origine qu'elles constituent des ensembles coadaptés, fortement structurés, résistants aux perturbations de leur milieu (Blondel, 1995). Mais cette résistance, acquise par des processus adaptatifs, les rend vulnérables aux colonisations. Les espèces introduites peuvent en effet avoir des conséquences désastreuses sur tout le système, en devenant des prédateurs, des compétiteurs et des parasites, et il semble que les introductions d'origine anthropique aient un impact encore plus important.

Les espèces forestières sont particulièrement vulnérables en milieu insulaire. En effet, par comparaison avec les espèces annuelles, leur longévité entraîne des générations chevauchantes, réduisant ainsi la taille efficace des populations, et augmentant les aires minimales requises pour leur conservation (Young et al., 2000).

Les arbres forestiers, avec leur distribution géographique variable (répartis sur presque tous les biomes terrestres, de façon plus ou moins étendue), leurs caractéristiques d'histoire de vie (grande durée de vie, accumulation de mutations, nombreux systèmes de reproduction et de dispersion), et la grande variété de stress auxquels ils sont assujettis (pollution, exploitation forestière, fragmentation, parasites) peuvent être considérés comme des paradigmes pour la génétique de la conservation (Young et al., 2000). Il existe encore peu d'études sur les espèces forestières en milieu fragmenté ou insulaire. Il a été prouvé que les espèces forestières endémiques étaient plus différenciées ( $G_{st} = 14\%$ ) que les espèces couvrant tout un continent ( $G_{st} = 3\%$ ) (Hamrick *et al.*, 1992). Hamrick et al. (1990) et Hamrick et Godt (1996) ont étudié la diversité génétique de forêts tropicales et mis en évidence les facteurs responsables de la différenciation entre populations (système de reproduction, histoire de vie, aire de distribution, etc.) mais n'ont pas considéré l'influence de l'insularité, c'est-à-dire de l'isolement et de la taille des populations. Face à ce manque de recherches sur les espèces





forestières en milieu insulaire, nous avons choisi de nous intéresser à l'espèce *Santalum austrocaledonicum*, espèce forestière endémique de Nouvelle-Calédonie et qui présente la particularité d'avoir subi une exploitation excessive par l'Homme pour son bois de cœur parfumé. L'étude de cette espèce nous a permis de nous intéresser au système insulaire particulier que constitue la Nouvelle-Calédonie. Cette dernière est en effet composée de quatre îles de petite taille et d'une île de plus grande taille, permettant d'étudier divers degrés d'insularité.

Cette thèse présente une étude exploratoire de l'espèce *Santalum austrocaledonicum*, sur laquelle aucune étude génétique n'avait encore été menée. Nous avons choisi d'aborder plusieurs domaines : la diversité génétique au moyen de marqueurs moléculaires neutres et l'étude de caractères phénotypiques potentiellement adaptatifs, afin de fournir une première vision générale sur la variabilité au sein de cette espèce. Les objectifs de l'étude sont plus précisément au nombre de trois :

(i) Comprendre l'impact des forces évolutives sur des marqueurs neutres (microsatellites chloroplastiques et nucléaires), ce qui nous permettra de mesurer l'impact de la dérive et de la migration, et de dresser des hypothèses quant à la colonisation du Santal dans l'archipel calédonien.

(ii) Comprendre quels sont les déterminants de la diversité phénotypique, potentiellement soumise à sélection. Nous étudierons pour cela différents types de caractères : la taille des feuilles (liée à la capture d'énergie solaire), la taille des graines (liée à la dissémination et la survie de l'embryon), la croissance, et un caractère chimique : la composition de l'huile essentielle du bois de Santal, *a priori* lié à la défense contre les parasites.

(iii) Associer les différentes approches pour élaborer une stratégie de conservation de l'espèce. La diversité d'une espèce s'appréhende non seulement en terme de caractères non soumis à sélection (marqueurs neutres) mais aussi de caractères quantitatifs soumis à la sélection (morphologie, chimie). Une stratégie de conservation doit donc prendre en compte l'ensemble de ces aspects. C'est avec cette méthode que nous allons tenter de dresser des zones de conservation dans le cas du Santal calédonien.

Cette thèse se structure en plusieurs chapitres complémentaires:



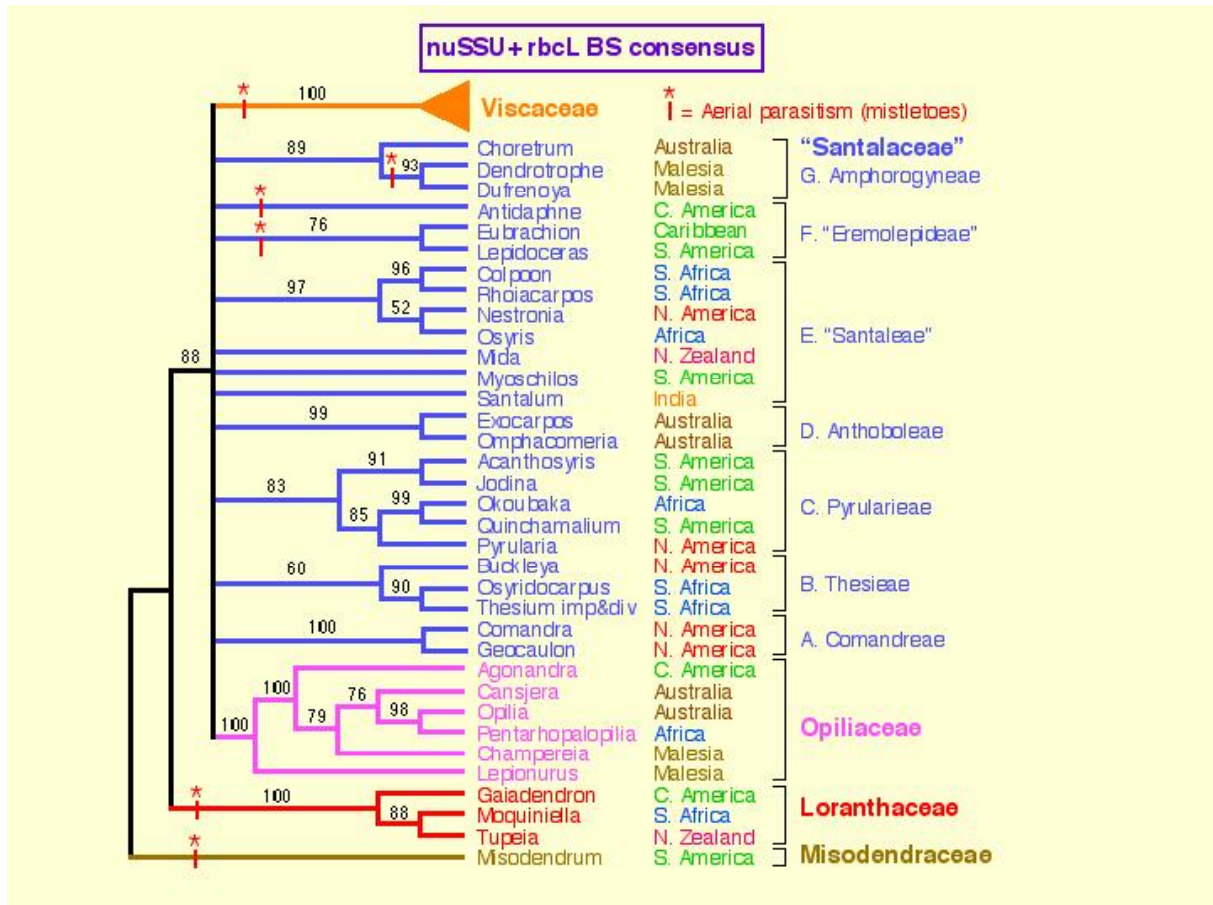
- Le premier chapitre présente l'espèce *Santalum austrocaledonicum* dans son milieu naturel, sa taxonomie, ses caractéristiques biologiques, et démographiques, un historique de son exploitation et la méthode d'échantillonnage de notre étude.
- Le second chapitre est consacré à l'étude de la diversité et de la structuration génétique, fondée sur l'analyse des microsatellites chloroplastiques et nucléaires, il résume et complète deux articles récemment publiés et un article accepté.
- Le troisième chapitre porte sur l'étude des caractères que sont la taille des feuilles et des graines ainsi que la croissance.
- Le quatrième est dédié à l'étude du caractère quantitatif plus particulier qu'est la composition chimique de l'huile essentielle.
- Le cinquième et dernier chapitre présente les mesures de conservation envisageables pour cette espèce compte tenu des résultats obtenus dans les précédents chapitres. Ce chapitre complète lui-aussi un article sous presse.



## ***CHAPITRE 1***

### ***Matériel biologique : le Santal de Nouvelle-Calédonie***

**Figure 1.1:** Reconstitution de la phylogénie des Santalaceae (Nickrent et Malécot, 2001)



Ce chapitre présente dans un premier temps la taxonomie de la famille des Santalaceae et leur répartition mondiale. Dans un second temps il s'intéresse à l'aire de répartition de l'espèce de Santal étudiée, *Santalum austrocaledonicum* : la Nouvelle-Calédonie. Nous découvrirons ensuite ses caractéristiques biologiques ainsi que sa répartition géographique dans l'archipel. Enfin nous expliciterons la méthode d'échantillonnage, adaptée à la taille des populations.

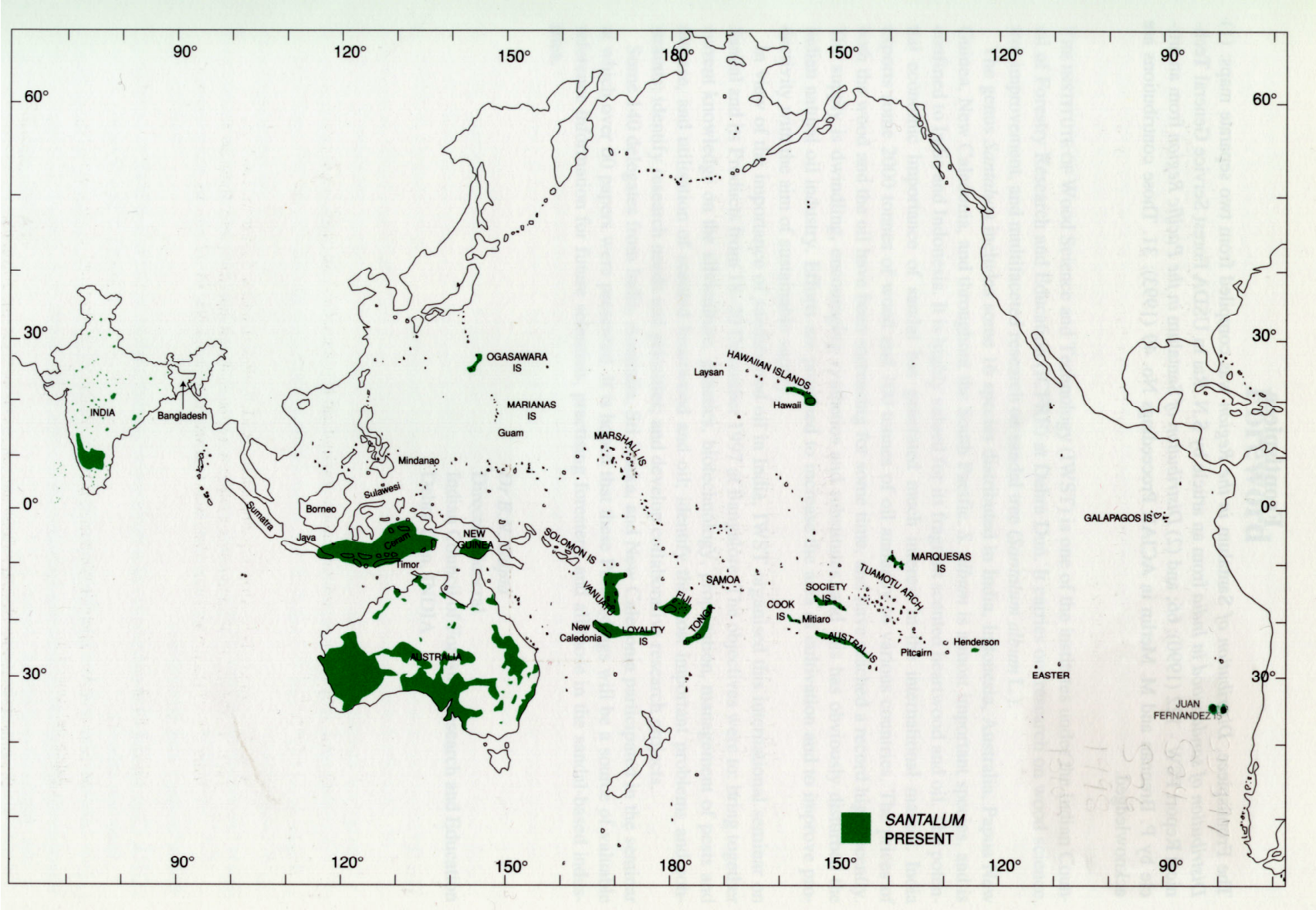
## 1.1. Taxonomie et répartition des espèces de Santal

La famille des Santalaceae (figure 1.1) est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 400 espèces réparties en 38 genres. Ce sont des arbres, des arbustes et des plantes herbacées, parfois à feuilles réduites, partiellement parasites des racines ou des parties aériennes de l'hôte, des régions tempérées à tropicales. En Europe, elle est représentée par les *Thesiums*, herbacées grêles, semi-parasites, à feuilles linéaires, alternes et à fleurs minuscules vert-jaunâtre.

Le genre *Santalum* regroupe 15 espèces (et une espèce récemment éteinte, *Santalum fernandezianum*) d'arbres et arbrisseaux, répartis dans l'ensemble du Pacifique et en Inde où il a été importé (figure 1.2). Des analyses phylogénétiques de ces 15 espèces, conduites actuellement par D. Harbaugh à l'Université de Berkeley (comm. pers.), et portant sur des séquences ITS et ETS de l'ADN ribosomal, et des séquences 3'trnK de l'ADN chloroplastique, ont révélé l'existence de phénomènes historiques biogéographiques de grande ampleur. Il semble que l'Australie soit l'origine de toutes les espèces de Santal, ce qui suppose des événements multiples de dispersion à longue distance fondateurs des populations du Pacifique et des événements de vicariance. Le concept de vicariance a été redéfini par Blondel (1995) comme reposant sur le principe de dichotomie (une aire ancestrale se subdivise en deux) sans exclure catégoriquement la possibilité de polytomies (plus de deux espèces-filles) en cas d'archipelisation de l'aire d'une espèce ancestrale. Ce principe s'applique dans le cas de la Nouvelle-Calédonie où la surrection d'une barrière naturelle (l'océan) entre l'Australie et la Nouvelle-Calédonie a éloigné ces deux entités autrefois reliées (Espirat, <http://www.brousse-en-folie.com/broussefolie/nc/geol.php>). Cette hypothèse de vicariance est appuyée par les résultats provisoires de la phylogénie (figure 1.3) qui montre que *S. austrocaledonicum* est phylogénétiquement très lié à *S. obtusifolium* d'Australie ce qui laisse supposer un lien direct entre ces deux espèces. La phylogénie révèle en outre un fait intéressant : *S. austrocaledonicum*, l'espèce que nous étudions, est scindée en deux : les individus originaires du Vanuatu, proches de l'espèce *S. lanceolatum* d'Australie, sont très



Figure 1.2 : Distribution du genre Santalum (Radomiljac *et al.* 1998)



éloignés de ceux de Nouvelle-Calédonie qui sont, eux, plus proches de *S. obtusifolium* d'Australie. D'après Veillon (1995), l'échantillonnage au Vanuatu n'était pas suffisant pour déterminer si *S. austrocaledonicum* était endémique du Vanuatu et de la Nouvelle-Calédonie ou seulement de Nouvelle-Calédonie. Cette phylogénie tendrait à prouver qu'il s'agit d'espèces différentes au Vanuatu en Nouvelle-Calédonie, ou qu'un processus de spéciation est en train d'avoir lieu. Notre étude ne concernera que la Nouvelle-Calédonie, où la seule espèce présente est sans controverse *Santalum austrocaledonicum*.

## **1.2. Le milieu naturel de *Santalum austrocaledonicum* : la Nouvelle-Calédonie**

### **1.2.1. Géographie physique**

La Nouvelle-Calédonie (figure 1.4) est située entre 163°35' et 168°8' de longitude Est et entre 18°34' et 22°40' de latitude Sud, c'est-à-dire aux antipodes de la France (18 368 km de la France), dans le Pacifique Sud, à environ 2 000 km à l'Est de l'Australie et au Nord-Ouest de la Nouvelle Zélande.

Elle est composée du Nord-Ouest au Sud-Est par :

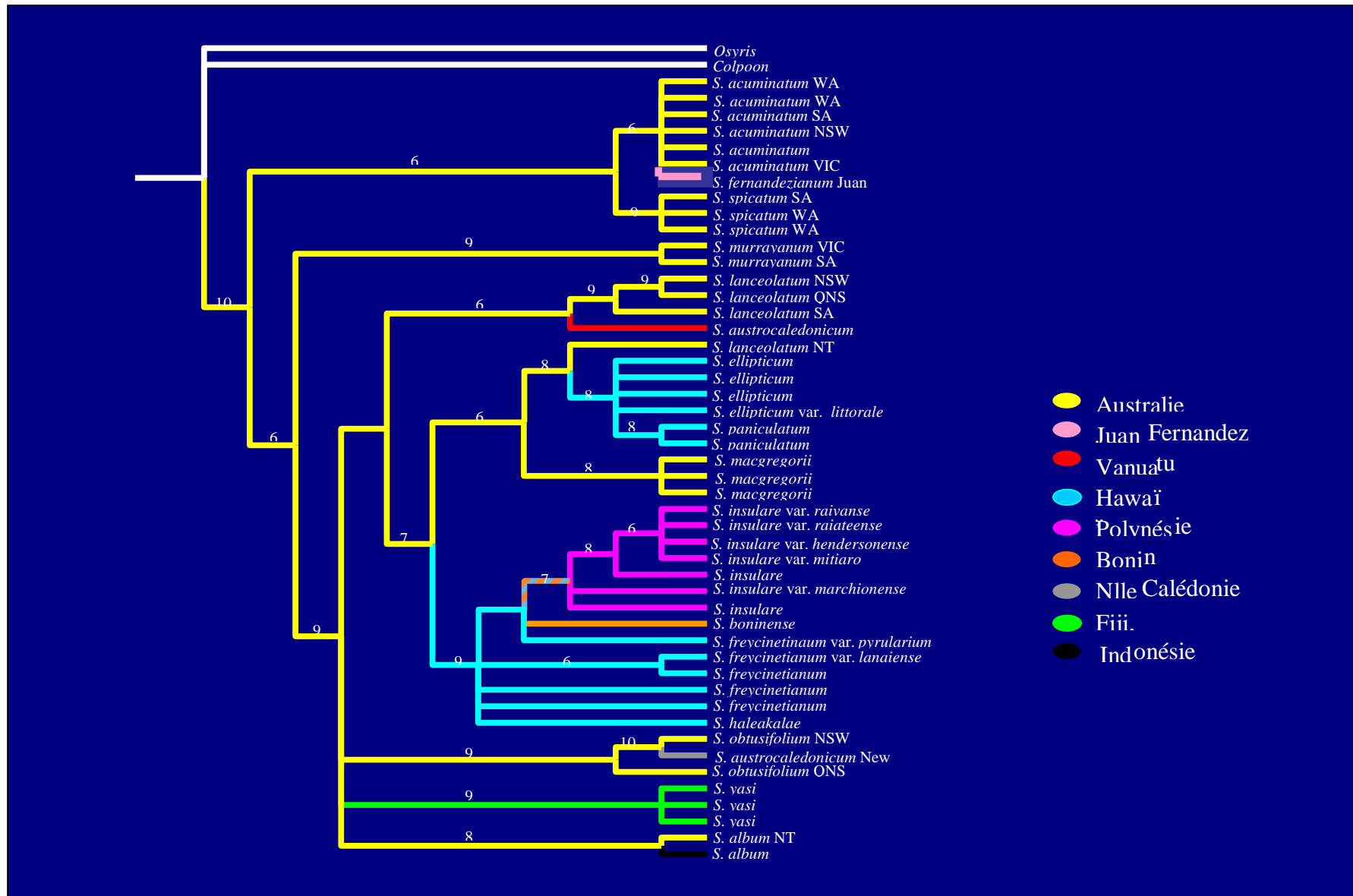
- l'archipel des Belep
- la Nouvelle-Calédonie au sens strict, encore appelée « Grande Terre »
- l'île des Pins ou Kunié

A 100 km à l'Est de Grande Terre, s'étire parallèlement le groupe des Loyautés avec, du Nord-Ouest au Sud-Est :

- Ouvéa
- Lifou
- Maré

L'histoire géologique de la Nouvelle-Calédonie a été dressée par Stevens (1977). Ce dernier établit qu'au Carbonifère (359-299 Ma) et au Permien (299-251 Ma), la Nouvelle-Calédonie (regroupant alors Grande Terre et l'île des Pins) se trouvait à la périphérie du continent de Gondwana qui regroupait l'Afrique, l'Amérique du sud, l'Antarctique, l'Inde, la Nouvelle Zélande et l'Australie. C'est au cours du Crétacé (145-70 Ma) que la flore d'Angiospermes tels que *Notofagus* et les *Proteaceae* auraient colonisé la Nouvelle-Calédonie, en provenance de ce qui deviendra l'Amérique du Sud, en suivant la marge antarctique du Gondwana. Au début de l'ère tertiaire (-65 à -2 Ma), la Nouvelle-Calédonie se déplace vers le nord en suivant

**Figure 1.3 :** Phylogéographie du genre *Santalum* obtenue par combinaison des données chloroplastiques et ribosomales (D. Harbaugh, comm. pers)



le mouvement de la plaque indo-australienne et se sépare des rives orientales de l'actuelle Australie par l'ouverture de la mer de Tasman (Griffiths, 1971 ; Stevens, 1980). La ride de Norfolk, structure sous-marine qui relie l'île nord de la Nouvelle-Zélande à la Nouvelle-Calédonie, est considérée par les géologues comme un vestige de la marge continentale du Gondwana. Si l'on connaît relativement bien l'histoire de la séparation de la Nouvelle-Calédonie de l'Australie, par contre, on ne sait pas pendant combien de temps la ride de Norfolk est restée émergée, permettant des échanges de faune et de flore terrestre avec la Nouvelle-Zélande. La Grande Terre et l'île des Pins ont donc une origine géologique commune. Elles sont actuellement séparées par un bras de mer mais ont par le passé été connectées, notamment lors de la dernière glaciation entre - 14 000 et - 9 000 ans avant notre ère (Stevenson *et al.*, 2001).

Les îles Loyauté quant à elles sont beaucoup plus récentes. Elles sont issues d'anciens volcans graduellement ennoyés alors que le corail croissait en hauteur en formant un anneau autour du volcan. Cette structure a ensuite évolué en atoll alors que les îles volcaniques disparaissaient sous les eaux. Au Quaternaire (il y a 1.8 million d'années) ces lagons comblés ont subi une surrection, donnant lieu aux actuelles îles calcaires que sont les Loyautés (Picard, 1999). Aujourd'hui, les îles de l'archipel calédonien se situent sur une même plaque, la plaque indo-australienne, qui s'enfonce progressivement (10 à 15 cm par an) par subduction sous le bassin Nord-fidjien au niveau de la fosse du Vanuatu, et seront donc amenées à disparaître d'ici 1 million d'année (Picard, 1999).

L'archipel est donc constitué de deux entités d'origine différentes : Grande Terre et l'île des Pins, d'origines gondwanienne, et les îles Loyauté, plus récentes issues de volcans ennoyés.

- La Grande Terre (16 350 m<sup>2</sup>) est un faisceau orienté Nord-Ouest / Sud-Est d'environ 400 km de long sur 40 à 70 km de large, traversée du nord au sud par un axe montagneux appelé « chaîne centrale » qui culmine à 1 628 m au Mont Panié. La chaîne centrale coupe l'île en deux régions distinctes :

- La côte Est, exposée aux alizés, et aux pluies, est la région la plus humide et la plus chaude. Une végétation dense couvre les pentes abruptes de cette côte.

- La côte Ouest, plus découpée, et beaucoup plus sèche, avec des plaines propres à la culture et à l'élevage, surplombées par des massifs riches en minerais.

Figure 1.4: la Nouvelle-Calédonie : localisation mondiale et carte de l'archipel.



- L'île des Pins (152 km<sup>2</sup>) est un dôme en roche basique, entourée d'une ceinture de corail surélevée. Le plateau central a pour altitude moyenne 100m.
- Ouvéa (132 km<sup>2</sup>) est un atoll semi-actif, en forme de croissant, prolongé au Nord et au Sud par un chapelet d'îlots : les Pléïades. L'île est régulièrement inclinée d'Est en Ouest, la façade littorale Est est constituée de falaises culminant à 46 m tandis que la partie Ouest est bordée d'une longue plage de sable blanc de 40 km. Sa structure inclinée est due à sa position sur la plaque indo-australienne qui possède un bombement lié à la pression exercée par la subduction.
- Lifou (1 196 km<sup>2</sup>) est un ancien atoll annulaire avec une barrière récifale et un lagon central. Elle a la forme d'une cuvette dont l'intérieur est surbaissé (altitude 30 m) et dont les bords sont relevés jusqu'à une altitude variant entre 40 et 80 m.
- Maré (650 km<sup>2</sup>) est une île intermédiaire entre un atoll et un récif barrière. Son relief est voisin de celui de Lifou. Son centre forme lui aussi une dépression d'une altitude moyenne de 50 m entourée de collines calcaires culminant à 138 m.

L'ensemble « Grande Terre », Loyauté et Ile des Pins, représente environ 19 000 km<sup>2</sup>. Le territoire a reçu le qualificatif de "Grande Terre Insulaire" de la part des géographes contemporains. Parmi eux, F. Doumengue (dans Le Bourdieu *et al.*, 1996) a défini la Nouvelle-Calédonie selon un indice côtier moyen (1/1,15) et un indice faible d'isolement (1/91).

### **1.2.2. Sols**

Selon l'origine géologique des îles, les sols rencontrés sont de nature fondamentalement différente. Dans les îles Loyauté, la roche mère est du calcaire récifal, sur laquelle les sols sont de fertilité médiocre mais de qualité très homogène. La qualité des sols dépend surtout de leur profondeur, les zones les plus profondes étant souvent favorables à l'agriculture. Sur l'île des Pins et Grande Terre, la roche mère est ultrabasique et les sols sont de nature très variée, parmi ceux ci, les 'terrains miniers' caractéristiques de Nouvelle-Calédonie, terrains peu riches en minéraux et toxiques pour de nombreuses plantes, sur lesquels se sont adaptés des végétaux spécifiques.



**Tableau 1.1** : description des populations étudiées, coordonnées, pluviométrie, nombre de mois secs, température annuelle moyenne et caractéristiques du sol. Données pluviométriques et de températures basées sur la moyenne des données annuelles entre 1971 et 2000. Source : Carte géologique 1/50 000 (notices explicatives), Atlas ORSTOM.

Ile [taille de l'île] (km <sup>2</sup> )	Population	Aire échantillonnée (km <sup>2</sup> )	Latitude Sud	Longitude Est	Pluviométrie (mm)	Nombre de mois secs	Température (°C)	Caractéristiques du sol
<b>GRANDE TERRE</b> [16 350]	Ouen Toro	0.19	22°30'	166°45'	1058	3.8	23.3	schistes et calcaires
	Pindai	3.43	21°31'	164°96'	894	5.4	23.1	alluvions anciennes
	Malhec	0.87	20°19'	164°10'	1202	4.4	ND	sols fersialitiques
	Paita	0.67	22°09'	166°22'	1165	ND	ND	grès, pélites
	Hienghène	0.57	20°43'	164°55'	2245	2	24.1	grès, schistes, pélites
	Tiéa	0.05	21°08'	164°56'	995	4.9	23.2	vertisol
<b>ILE DES PINS</b> [152]	IP North	32.25	22°35'	167°28'	1532	2.2	22.4	sable corallien consolidé
	IP South	25.25	22°39'	167°28'	1419	2.4	24	sable corallien consolidé
					1475.5	2.3	23.2	
<b>LIFOU</b> [1196]	Lifou North	275.28	20°42'	167°13'	1699	2.4	22.9	Sols calcimagnésiques sur calcaires
	Lifou Middle	271.81	20°58'	167°04'	1642	2.7	23.7	Sols calcimagnésiques sur calcaires
	Lifou South	96.95	21°01'	167°22'	2065	1.4	23.5	Sols calcimagnésiques sur calcaires
<b>MARE</b> [650]	Maré North West	125.32	21°24'	167°52'	1300	ND	23.1	Sols calcimagnésiques sur calcaires
	Maré South West	118.91	21°35'	167°53'	1400	2.5	22	Sols calcimagnésiques sur calcaires
	Maré East	89.18	21°33'	168°05'	1703	2.3	ND	Sols calcimagnésiques sur calcaires
<b>OUVEA</b> [132]	Ouvéa North	45.872	20°27'	166°36'	1440	ND	ND	Sols calcimagnésiques sur calcaires
	Ouvéa Middle	21.399	20°38'	166°34'	1440	3.7	24.1	Sols calcimagnésiques sur calcaires
	Ouvéa South	20.576	20°43'	166°25'	1446	ND	ND	Sols calcimagnésiques sur calcaires

### **1.2.3. Climat**

La Nouvelle-Calédonie possède un climat subtropical, tempéré par l'influence océanique et les alizés du Sud-Est. On y distingue 4 saisons : une saison chaude de mi-novembre à mi-avril avec des températures moyennes de 25°C à 27°C et une saison fraîche de mi-mai à mi-septembre avec des températures avoisinant les 20°C, séparées par deux saisons de transition. L'île des Pins se particularise par son climat beaucoup plus tempéré et plus frais (4°C de moins en température moyenne). Mais globalement les températures sont très peu variables au sein de l'archipel (tableau 1.1, figure 1.5).

### **1.2.4. Précipitations et Humidité**

Les précipitations se caractérisent par une grande irrégularité annuelle et mensuelle. Il existe un gradient de pluviométrie sur les îles Loyauté, Lifou étant l'île la plus arrosée. De même, sur Grande Terre, la côte Est possède une pluviométrie importante, alors que la côte Ouest, isolée des nuages par la barrière constituée par la montagne centrale de l'île, est beaucoup plus sèche (tableau 1.1, figure 1.5). L'humidité a une valeur moyenne de 80% sur l'année dans l'archipel avec des minima de 30 à 40% autour du mois de septembre.

### **1.2.5. Végétation**

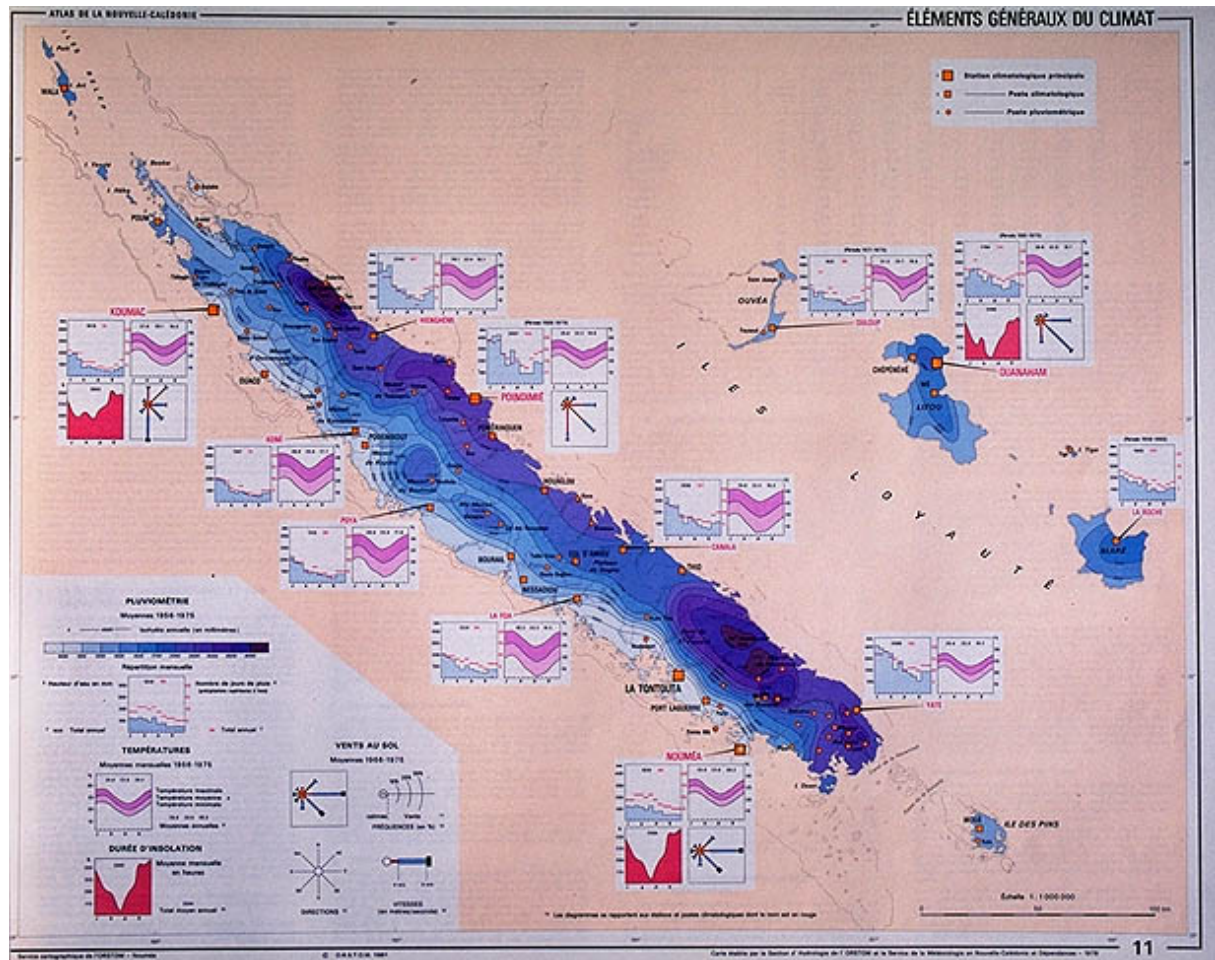
Les caractéristiques de la Nouvelle-Calédonie, déterminées par sa géologie, l'ancienneté de son isolement géographique, ainsi que sa situation en zone inter-tropicale, sont à l'origine du développement d'une faune et d'une flore originales qui présentent une grande diversité et un taux d'endémisme élevé.

En premier lieu, il convient de souligner la richesse de la Nouvelle-Calédonie en Gymnospermes. Avec 44 espèces – dont 43 endémiques – réparties en 15 genres (Laubenfels, 1972), elle est la région tropicale au monde ayant la plus forte concentration d'espèces de ce groupe qui possédait plus de 20 000 espèces différentes au Mésozoïque (-265 à -66 Ma), mais n'est plus représenté aujourd'hui que par quelque 600 espèces (Aubréville, 1973).

Les Angiospermes sont aussi bien représentées en Nouvelle-Calédonie, et comprennent également de nombreux groupes à caractères archaïques (pollen uni-aperturé, vaisseaux imparfaits, fleurs encore trimères et disposition spiralée des pièces florales) qui apparaissent comme des vestiges d'un vieux fond floristique gondwanien. Plusieurs genres appartenant à des familles primitives sont endémiques ou subendémiques (centrés sur la Nouvelle-Calédonie). L'importance des familles d'origine gondwanienne, tant par le nombre des espèces que par l'abondance de certaines d'entre elles dans différentes formations végétales contraste



**Figure 1.5** : Pluviométrie et température moyenne dans l'archipel calédonien (en bleu : courbes de pluviométrie, en rose : courbes de température) (issu de l'Atlas de Nouvelle-Calédonie, ORSTOM).



avec la faible représentation dans les formations végétales autochtones de groupes plus modernes tel que les Composées, les Graminées, les Labiées et les Mélastomatacées. Les groupes d'origine gondwanienne les plus remarquables de la flore de Nouvelle-Calédonie comprennent notamment les familles des Cunoniacées, des Protéacées et des Myrtacées (Richier de Forges, 1998).

Notons que si de nombreuses familles sont d'origine gondwanienne, la richesse locale et l'endémisme au niveau spécifique ne possèdent pas nécessairement une origine gondwanienne et résulteraient d'une radiation postérieure à la séparation de la Calédonie du continent gondwanien (Murienne, 2005).

Les particularités de la flore de Nouvelle-Calédonie, notamment la présence de nombreux genres et familles à caractères archaïques, ont conduit très tôt différents auteurs (Guillaumin, 1928 ; Good, 1964 ; Balgooy, 1971 ; Takhtajan, 1969) à faire de la Nouvelle-Calédonie une entité floristique à part entière.

Les affinités floristiques de la Nouvelle-Calédonie ont fait l'objet d'une synthèse récente par Morat et al. (1993). Les résultats révèlent que la Nouvelle-Calédonie a des affinités floristiques les plus fortes avec l'Australie (26.14%) suivi assez loin par la Nouvelle-Guinée (18.86%) et la Malaisie (13.31%). La Nouvelle-Zélande, en dépit de son climat tempéré et d'un appauvrissement en éléments les plus thermophiles de sa flore au cours des périodes glaciaires, a des affinités plus forte avec la Nouvelle-Calédonie que n'ont la Polynésie et le Pacifique Nord. Les auteurs soulignent en outre que les aires de distribution de la très grande majorité des genres, à l'exception des genres sub-antarctiques, sont situées à l'Ouest de la Nouvelle-Calédonie, confirmant une origine occidentale de la majorité de sa flore.

Aujourd'hui, l'ensemble de la flore calédonienne comprend plus de 3 700 espèces dont 2 500 endémiques (soit près de 70%). En outre, la famille des Santalaceae y est représentée par 11 espèces dont 10 endémiques.

Les originalités de la Nouvelle-Calédonie positionnent cette dernière parmi les 25 « points chauds » (Myers, 2000) de la biodiversité mondiale, englobant 4 des 238 écorégions identifiées à travers le monde (Olson, 2002) : les forêts humides, les forêts sèches, le récif corallien, les rivières et ruisseaux. Une écorégion est une unité relativement vaste de terre ou d'eau contenant un ensemble de communautés naturelles distinctes. Chacune, englobant une grande variété d'espèces, de dynamiques et de conditions environnementales, fonctionne comme une unité de conservation. Les écorégions représentent chacune une part unique du patrimoine naturel mondial et sont encore largement méconnues. Elles subissent souvent, à



**Figure 1.6 :** *Santalum austrocaledonicum* : a Ouen Toro, b: Malhec, c et d: Maré



des degrés divers, des dommages irrémédiables dus aux pressions humaines. Cette situation est notamment criante en ce qui concerne les forêts sèches.

### **1.3. Caractéristiques biologiques et écologiques de *Santalum austrocaledonicum***

#### **1.3.1. Caractéristiques botaniques**

Espèce botanique : *Santalum austrocaledonicum*

Nom commun : Santal

Famille : Santalaceae

Nom vernaculaire : Tepeka (Lifou), Ouâta (Ouvéa), Tapakae ou Outchiken (Ile des Pins).

C'est vraisemblablement Vieillard qui collecta, en 1855, le premier échantillon d'herbier de Santal en Nouvelle-Calédonie et le nomma *Santalum austrocaledonicum*.

*Santalum austrocaledonicum* (figure 1.6) est un petit arbre de taille moyenne comprise entre 2 et 10 m, dont le diamètre pris à 1,30 m au-dessus du sol peut atteindre 25 à 30 cm à maturité.

Les feuilles (figure 1.7) sont opposées, décussées, à limbe ovale, vert brillant sur la face supérieure, glauque sur la face inférieure. Les variations de forme et de couleur semblent assez importantes selon le site, l'âge ou l'origine du sujet. Le feuillage est fin et assez touffu, vert clair et brillant.

Les rameaux sont brun-rouge, recouverts d'une légère fluorescence blanche. La ramification sympodiale donne une structure très sinueuse caractéristique.

Les fleurs sont petites, blanches verdâtres, disposées en corymbe (figure 1.7). Les inflorescences sont terminales. La fleur est apétale avec quatre étamines opposées aux sépales (figure 1.8). L'ovaire est en position infère. Il y a vraisemblablement plusieurs périodes de floraison (étalées sur l'année). Le fruit est une drupe charnue verte, violette, puis noire à maturité, semblable à une petite cerise noire ovoïde (8 mm x 5 mm environ) terminée par une pointe contenue dans une cupule (figure 1.8 et 1.9).

Le semis et le jeune plant présentent un feuillage très différent de la plante adulte (forme de jeunesse très caractéristique), avec des feuilles longues et effilées (figure 1.10) alors que les feuilles d'arbres adultes sont plus courtes et plus larges (figure 1.7).

En fait, on remarque des variations assez sensibles sur des arbres adultes concernant le port de l'arbre, la forme et la taille des feuilles, la couleur et l'aspect de l'écorce et la couleur du bois.



**Figure 1.7:** feuilles et fleurs de *Santalum austrocaledonicum*, Maré



**Figure 1.9 :** fruits de *Santalum austrocaledonicum*, Maré



**Figure 1.10 :** feuilles d'individu juvénile de *Santalum austrocaledonicum*



Des travaux ont été menés au CTFT (Centre Technique Forestier Tropical) associé au Muséum d'Histoire Naturelle pour distinguer des éventuelles espèces ou sous-espèces ou variétés. Une révision de la famille de Santalaceae a été entreprise par Hallé en 1988 dans le cadre de l'édition de la Flore de Nouvelle-Calédonie et Dépendances.

Trois variétés sont identifiées sur la base de critères morphologiques multiples (notamment la forme, la couleur, et la pilosité des feuilles adultes et juvéniles) que nous ne détaillerons pas ici. Les différentes variétés sont présentées en figure 1.11 :

- *Santalum austrocaledonicum* variété *austrocaledonicum*, la plus importante, s'étend sur l'ensemble de la Nouvelle-Calédonie. Cette variété paraît s'accommoder de terrains divers, mais elle affectionne particulièrement les plateaux et terrasses calcaires à substrat madréporique ; elle est localisée de 5 à 150 m d'altitude.

- *Santalum austrocaledonicum* variété *pilosulum*, qui a été très récoltée aux environs de Nouméa. Des récoltes anciennes tendent à trouver que celle-ci aurait pu s'étendre sur la chaîne centrale, les régions côtières du Sud Ouest et la plaine des Lacs (Sud de Grande Terre). Cette variété est très proche de la première sur le plan des fruits, du bois, et des caractères internes des fleurs.

- *Santalum austrocaledonicum* variété *minutum*, dérive de la précédente ; il paraît n'exister qu'un peuplement très localisé dans la presqu'île de Poum (Nord de Grande Terre).

Dans notre étude, toutes les variétés ont été récoltées, mais *minutum*, récoltée dans la localité de Koumak, n'a pas été conservée pour l'analyse statistique du fait du nombre trop faible d'individus récoltés.

### 1.3.2. Hémiparasitisme

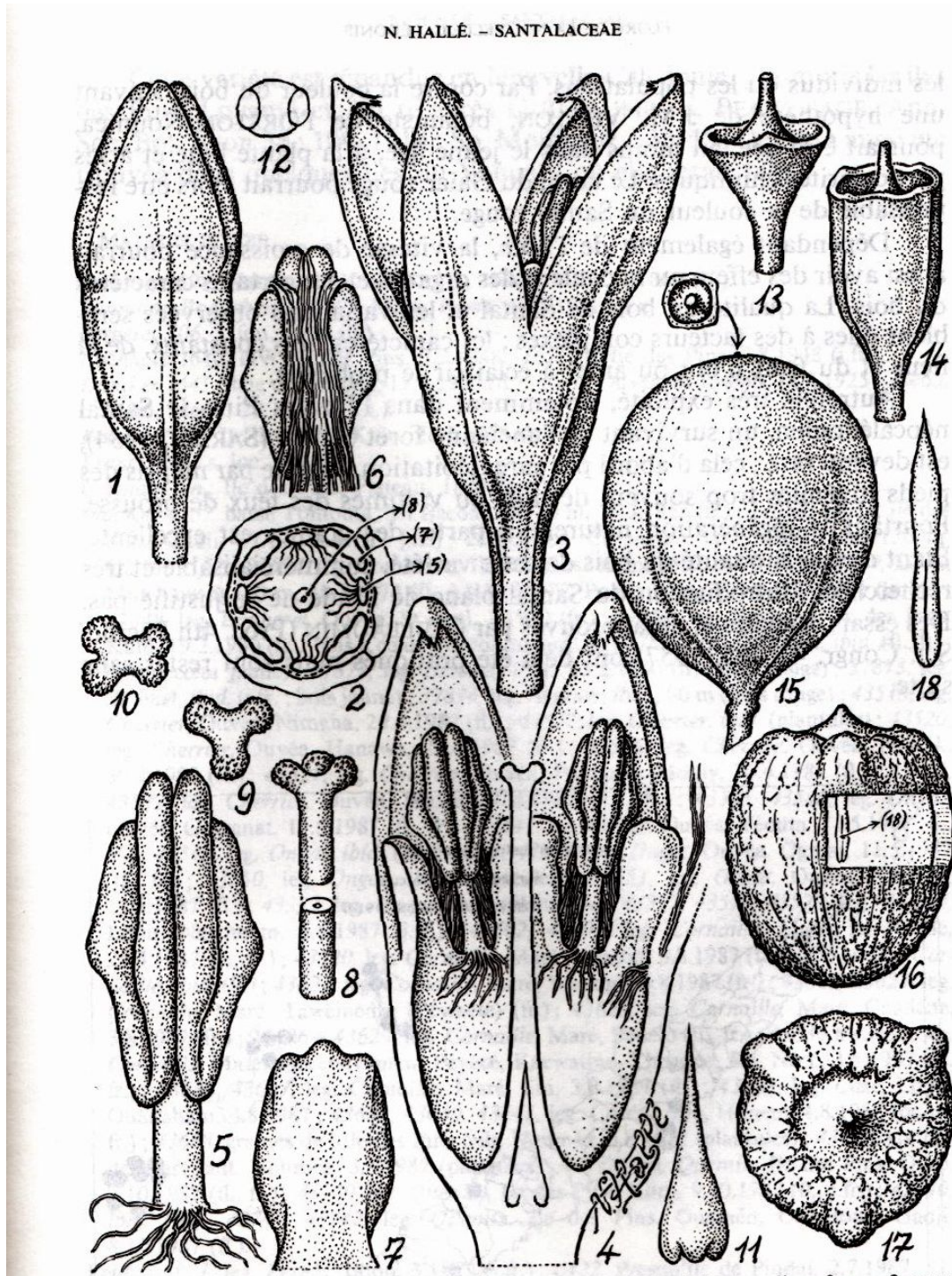
Bien que ce soit l'une des particularités les plus importantes du Santal, l'hémiparasitisme de ce genre a été peu étudié. Les recherches de Barber (1906, 1907) en Inde sur *S. album* ont permis cependant de dresser de premières conclusions :

- Une partie des racines du Santal est munie de suçoirs ou haustoria (figure 1.12) qui parasitent les racines des plantes voisines (appelées plantes-hôtes) afin d'y puiser tous les aliments qui leur manquent.
- Le parasitisme favorise significativement la croissance du Santal, mais toutes les plantes-hôtes ne conviennent pas et l'association Santal/plante-hôte est plus ou moins efficace selon les espèces de plantes-hôtes et les conditions du milieu
- On a pu observer 250 plants associés à *Santalum album* dans son habitat naturel. Certaines associations se sont révélées très favorables à sa croissance.



**Figure 1.8 :** caractéristiques morphologiques des fleurs et fruits de *Santalum austrocaledonicum* Vieill. var. *austrocaledonicum*. Extrait de Hallé (1988.)

1 : bouton, diamètre 3 mm ; 2 : coupe transversale schématique du bouton ; 3 : fleur haute de 9 mm ; 4 : fleur, coupe longitudinale, style de 3.9mm ; 5, 6 : étamine recto et verso, large de 1 mm ; 7 : lobe distal face extérieure, haut de 1.3 mm ; 8 : style et stigmate, large de 0.2 mm ; 9, 10 : stigmates vus du dessus ; 11 : placenta triovulé long de 1.7 mm ; 12 : placenta biovulé, coupe transversale ; 13 : réceptacle de vieille fleur, diamètre de 2.3 mm ; 14 : réceptacle de fleur nouée ; 15 : fruit mûr, diamètre 14.5 mm et sa couronne ; 16, 17 : noyau, diamètre 8 mm ; 18 : embryon long de 4.2 mm



D'un point de vue pathologique, peu de membres du genre *Santalum* ont un impact négatif sur les plantes cultivées, en revanche, l'inverse est vrai, notamment pour *S. album* qui est très cultivé et pour qui par exemple *Pyricularia pubera* (Santalaceae) peut être une espèce pathogène (Nickrent et Musselman 2004).

*Santalum austrocaledonicum* n'avait quant à lui jamais fait l'objet d'études précises sur ce point avant Quémin (1988). Ce dernier a tiré plusieurs conclusions de son étude par analyses racinaires dans un dispositif contrôlé :

- L'hémiparasitisme du Santal est identifié et repéré au niveau du suçoir de faible dimension (2 à 5 mm) et de couleur pouvant varier du brun au blanc.
- La prospection racinaire et parasitaire du Santal est étendue. Ex : sur un rayon de 3 m pour un arbre de 3.5 m de haut.
- L'émission de suçoirs semble se porter sur la plupart des espèces présentes dans le milieu y compris toutes les espèces herbacées.
- Le parasitisme a un effet significatif sur la croissance du Santal (une plante-hôte est même absolument indispensable à la croissance du jeune plant).

Comme on pourrait s'y attendre, le Santal semble privilégier les hôtes fixateurs d'azote (étude sur *Santalum acuminatum* de Pate, 2001).

L'hypothèse que le Santal puisse s'affranchir du parasitisme au terme d'un certain nombre d'années paraît aujourd'hui très peu probable.

Ce parasitisme engendre des désavantages dans les mises en place de plantations de Santal. En effet ces plantations requièrent de placer des plantes-hôtes significativement intéressantes pour la croissance du Santal (vigoureuses, suffisamment de racines), et de créer un dispositif de plantation régulièrement surveillé afin de maintenir l'équilibre Santal / plante-hôte de sorte à ce que l'un ne domine pas l'autre et ne l'épuise.

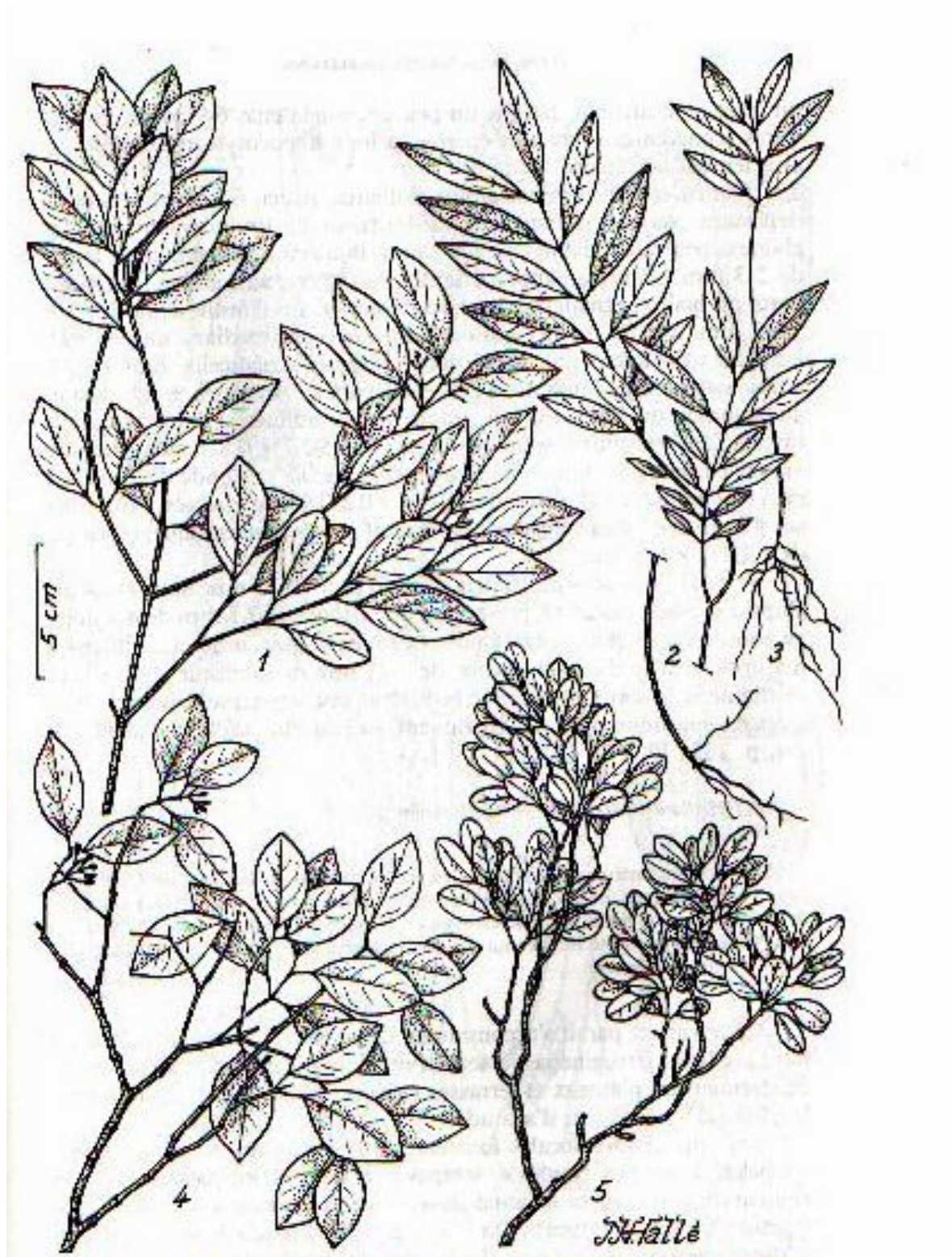
### 1.3.3. Croissance

Le rapport entre la taille d'un arbre et son âge reflète clairement la vigueur inhérente de l'arbre mais dépend aussi en grande partie des conditions environnementales sous lesquelles il se développe (Brack, 1997). Les facteurs environnementaux qui influencent la croissance incluent :

1. les facteurs climatiques, par exemple la température de l'air, l'humidité, l'énergie solaire, les précipitations, le vent ;
2. les facteurs de sol, notamment les propriétés physiques et chimiques, l'humidité et les micro-organismes du sol ;



**Figure 1.11** : Appareil végétatif de *Santalum austrocaledonicum* Vieill. Variété *pilosulum* Hallé : 1, rameaux feuillés ; variété *austrocaledonicum* : 2, 3 plantules, 4, rameaux feuillés ; variété *minutum* Hallé : 5, rameaux feuillés. (Hallé, 1988)



3. les facteurs topographiques, tels que la pente ou l'altitude ;
4. les facteurs de compétition : la présence d'autres espèces végétales, d'animaux herbivores, ou l'intervention de l'homme.

La croissance de *Santalum austrocaledonicum* n'avait jusqu'alors jamais été mesurée. Récemment, une campagne de mesures a donc été conduite sur des individus de différentes provenances, et en milieu contrôlé (l'essai Kaddour dont nous reparlerons au chapitre 3), permettant ainsi de s'affranchir des conditions environnementales différentes selon les sites. Les mesures ont été faites, par le personnel technique de l'Institut Agronomique Calédonien (IAC), à 18, 36, et 84 mois, qui correspondent à des périodes de maturation croissante des arbres. Les courbes de croissance en hauteur présentées en figure 1.13.a. montrent que les populations de Ouen Toro et de l'île des Pins ne suivent pas une sigmoïde comme attendu. Deux explications sont possibles et non exclusives : (i) le changement de méthode de mesure entre le 36<sup>ème</sup> et le 84<sup>ème</sup> mois a créé un biais dans les résultats, (ii) il y a eu un phénomène de « descente de cime », autrement dit les cimes des arbres se sont abaissées en raison d'un déséquilibre physiologique lié à la présence de parasites ou de mauvaises conditions environnementales dans l'essai. Devant ce résultat, seule la première partie de la courbe (entre 18 et 36 mois) est interprétable, et permet de déceler des différences de croissance entre provenances. On remarque en effet que les individus des Loyautés (Ouvéa, mais surtout Maré) ont une taille plus faible à 18 et 36 mois que la population de Grande Terre (Ouen Toro), et l'île des Pins. Les plantes du Vanuatu, qui avaient été incluses dans cette étude, montrent une courbe similaire à celle des Loyautés. Les mesures de circonférences au collet et à 1,30m ont été effectuées à 36 mois et 84 mois, sans changement de la méthode de mesure (figure 1.13.b). Elles montrent un résultat similaire à la hauteur, c'est-à-dire des troncs plus grands dans les Loyautés et au Vanuatu que sur Grande Terre et l'île des Pins. L'essai étant réalisé en milieu contrôlé, nous pouvons conclure que ces différences de croissance sont héréditaires.

### **1.3.4. Reproduction**

#### **Reproduction sexuée**

La floraison s'échelonne sur toute l'année avec un maximum en janvier / février et une fructification 2 mois plus tard. Le Santal est une espèce *a priori* majoritairement allogame (Tassin, *comm. pers*), des études sont en cours actuellement en Nouvelle-Calédonie (menées par Isabelle Olivieri de l'ISEM, Montpellier) pour déterminer plus précisément son taux d'autogamie en milieu naturel (cf chapitre 2.9.). Le pollen est disséminé principalement par

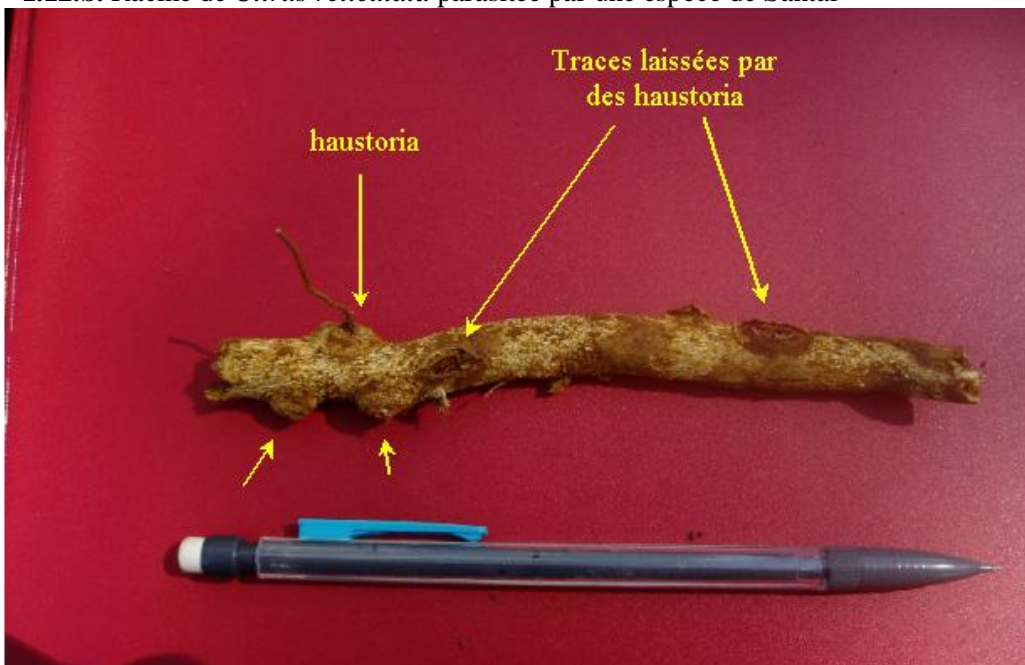


**Figure 1.12:** haustoria de Santal

**1.12.a.** : haustorium de *Santalum austrocaledonicum* sur une racine de plante-hôte



**1.12.b.** Racine de *Citrus reticulata* parasitée par une espèce de Santal



les insectes (Hyménoptères, Diptères, Lépidoptères), et les graines, comestibles, sont dispersées par les oiseaux (Hallé, 1988).

### **Reproduction asexuée**

Le Santal coupé peut rejeter à partir des souches si les conditions d'éclairement sont favorables (ombrage latéral, éclairement vertical) et si la souche n'est pas trop âgée.

Après exploitation, avec ou sans arrachage des souches, ou après passage d'un feu (événement fréquent en Nouvelle-Calédonie), le Santal peut aussi émettre des drageons (rejets issus de bourgeons adventifs développés sur des racines). Cette potentialité de drageonnage a certainement joué un grand rôle dans sa survie après les exploitations massives du XIX<sup>ème</sup> siècle, et les fréquents feux de brousse.

L'influence du drageonnage (et donc de la clonalité) chez *Santalum austrocaledonicum* est d'autant plus probable que des études ont déjà montré l'importance de ce phénomène chez d'autres espèces de Santal. Warburton *et al.* (2000) ont étudié quelques populations menacées de *Santalum lanceolatum*, dans la région de Victoria en Australie, et leurs résultats indiquent que ces populations ne sont constituées que d'un seul individu génétique chacune, et que la croissance de la population se fait uniquement par reproduction végétative. De même Lhuillier (2005) a mis en évidence un très haut degré de clonalité du au drageonnage chez *Santalum insulare*, pour lequel près de 58% des arbres analysés se sont révélés être des clones.

### **Production de plants en pépinière.**

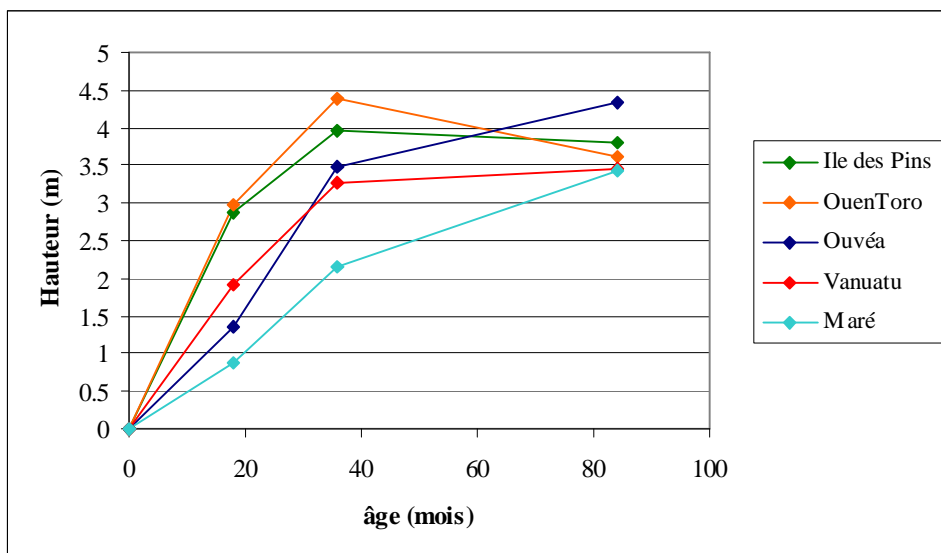
Le Santal est une espèce délicate à faire croître en pépinière de par les conditions environnementales requises par la graine (levée de dormance) et la jeune plantule (présence d'une plante-hôte). Cependant la technique de plantation à partir de graines récoltées dans la nature est aujourd'hui au point (Erhart, 1996 ; Nasi et Erhart, 1999) et permet de remplacer les arbres coupés par de nouveaux plants.

#### **1.3.5. Bois**

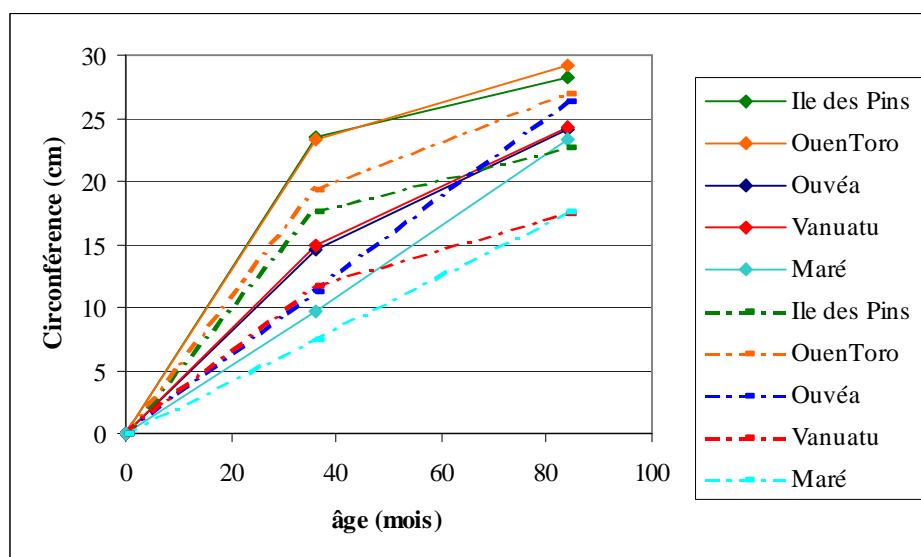
La couleur du bois de *Santalum austrocaledonicum* varie selon les individus. Suivant une hypothèse de J.M. Veillon, botaniste de l'ORSTOM-Nouméa (Hallé, 1988) cette variation pourrait être liée, au moins dans le jeune âge, à la plante-hôte et à ses particularités chimiques. Notamment, le tanin du Gaiac rouge pourrait alors être responsable de la couleur du Santal dit « rouge ». Dépendant également de l'hôte, la vitesse de croissance pourrait aussi avoir des

**Figure 1.13** : Mesures de croissance en hauteur et circonférence en milieu contrôlé pour 5 provenances : île des Pins (moyenne sur 200 individus), Ouen Toro (moyenne sur 15 indiv.), Ouvéa (moyenne sur 10 indiv.), Vanuatu (moyenne sur 60 indiv.) et Maré (moyenne sur 200 indiv.).

a/ Hauteur



b/ Circonférence. Traits pleins : circonférence mesurée au collet ; pointillés : circonférence mesurée à 1,30m du sol.



c/ Tableau récapitulatif des données pour chaque provenance : M = Moyennes, ET = Ecart-types (non figurés sur les graphiques du fait de leur superposition).

Provenance		Hauteur			Circonférence au collet		Circonférence à 1,30 m	
		18 mois	36 mois	84 mois	36 mois	84 mois	36 mois	84 mois
Ile des Pins	M	2.87	3.95	3.80	23.44	28.22	17.55	22.68
	ET	0.71	0.68	0.65	4.91	5.19	4.36	4.36
Ouen Toro	M	2.99	4.39	3.63	23.27	29.14	19.30	27.00
	ET	1.05	0.73	1.48	6.19	11.64	2.88	8.49
Ouvéa	M	1.37	3.48	4.34	14.53	24.11	11.23	26.33
	ET	0.25	0.30	0.41	1.76	14.99	2.18	2.08
Vanuatu	M	1.91	3.27	3.47	14.88	24.22	11.72	17.48
	ET	0.84	0.76	0.84	6.01	6.36	3.64	4.82
maré	M	0.88	2.16	3.43	9.72	23.26	7.54	17.63
	ET	0.28	0.51	0.76	2.92	5.01	2.22	4.26

effets sur la couleur des organes et sur certains caractères du bois. La qualité du bois de Santal et les variations observées semblent dues à des facteurs complexes qui n'ont pas encore été éclaircis (Hallé, 1988).

Le bois de *Santalum austrocaledonicum* possède une odeur très parfumée. L'essence qui en est extraite par distillation est fortement prisée en parfumerie et en pharmacie, au point d'être l'un des bois les plus chers au monde et d'être vendu au kg : son prix actuel varie de 45 000 à 50 000 FCFP soit 377 à 419 euros le kg. Le quota annuel de coupe à l'heure actuelle est de 30 tonnes de bois de cœur à l'année, soit 600 à 750 arbres, ce qui correspond, pour un rendement de 3%, à 900 kg d'huile essentielle.

### **1.3.6. Dynamique des populations, écologie**

*Santalum austrocaledonicum* se limite à la zone de basse altitude (inférieure à 200m) car il ne supporte pas le froid. Une température mensuelle minimum de 15°C semble la limite de son extension (Hallé, 1988). Le type de sol et sa profondeur ne semblent pas être des facteurs déterminants quant à sa distribution. Le parasitisme pourrait lui permettre de s'affranchir en partie de cette contrainte. Les prospections sur le terrain ont permis de constater qu'il pouvait s'adapter à différents types de milieux sans en être caractéristique. On le retrouve en effet aussi bien en forêt basse qu'en formations dégradées, mais son habitat de prédilection semble être les formations ouvertes buissonnantes en lisière de forêt et les zones cultivées.

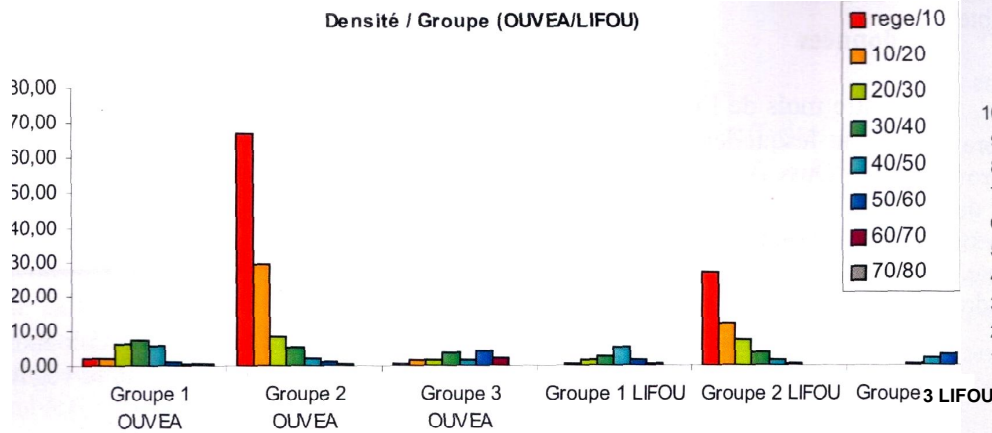
La lumière s'avère être un facteur limitant lorsqu'elle n'arrive pas en assez grande quantité au sol pour la germination des graines, ou sur les souches et les racines afin de déclencher la pousse de rejets ou de drageons. C'est le cas en forêt où l'on trouve généralement quelques rares pieds isolés, mais de fortes dimensions, montrant que ceux-ci ne peuvent se régénérer que par accident (trouées, oiseaux). Il semble donc que le Santal joue un rôle pionnier, mais que les formations végétales denses s'opposent à son expansion.

Les inventaires récemment menés (Brinkert, 2003 ; Steirer, 2004) ont permis de confirmer que la distribution des classes de circonférence du Santal dépendait de la composition de la végétation. La présence de Santal est liée à celle de territoires anthropisés (63 % des arbres sur Maré se trouvent sur ces milieux, 59 % de ceux de Lifou, et 64 % de ceux d'Ouvéa), alors que le Santal est plutôt rare dans les forêts primaires (4 % sur Maré, 0,2 % sur Lifou, 2 % sur Ouvéa).

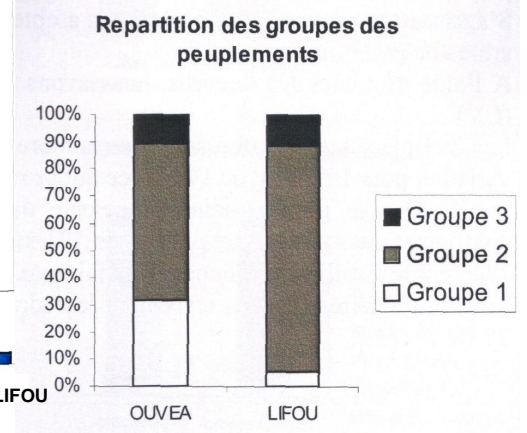
Les inventaires ont en outre permis de constater que l'état des peuplements n'était pas uniforme au sein des îles. Steirer (2004) désigne en effet trois types de peuplements (figure 1.14.a) sur Lifou et Ouvéa : ceux présentant une répartition « équilibrée » des classes de

**Figure 1.14:** Groupes démographiques établis suite aux inventaires de Ouvéa et Lifou (a) (Steierer, 2004), et de Maré (b)(Brinkert, 2003). Répartition de ces groupes de peuplement selon les îles pour Ouvéa et Lifou (c). Distribution relative des placettes inventoriées par groupe de structure au sein de chaque population sur Maré (d).

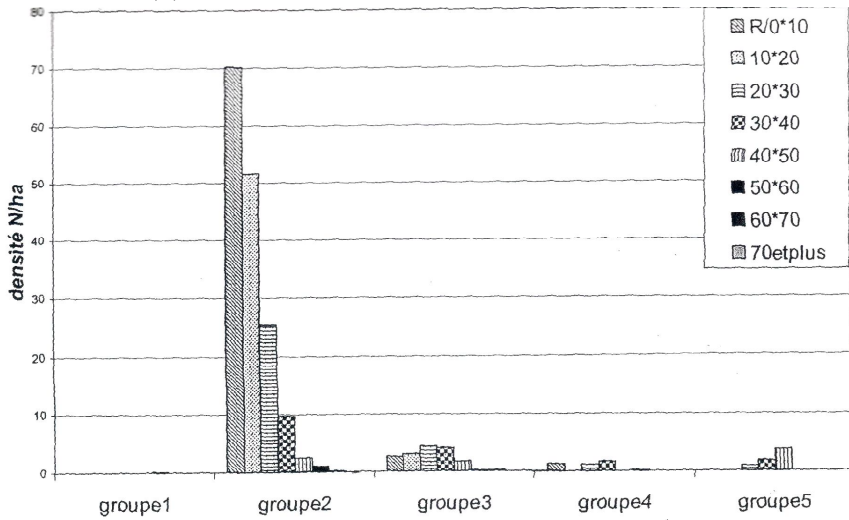
(a)



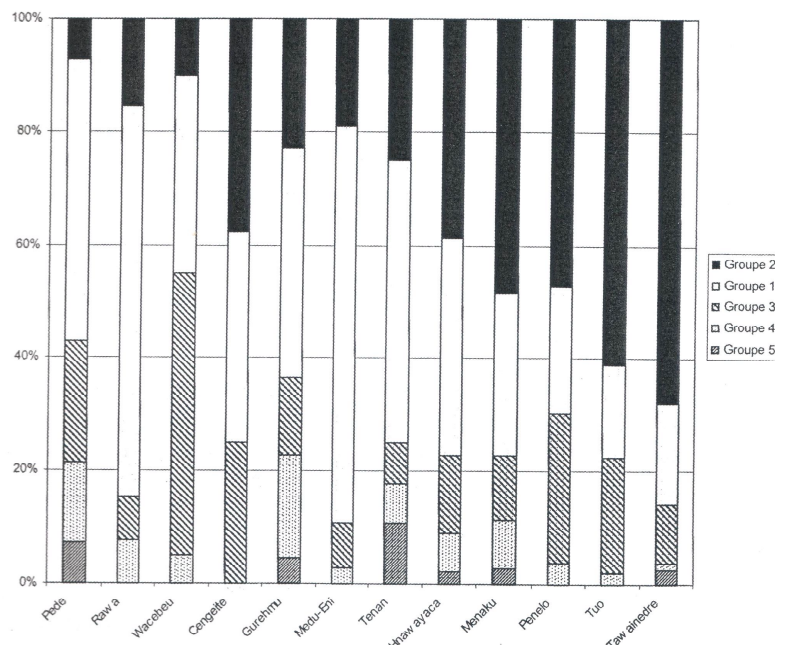
(c)



(b)



(d)



circonférence (groupe 1) ; ceux présentant une courbe en cloche (groupe 2), donc une régénération peu importante ; et ceux présentant aussi une faible régénération, mais de nombreux arbres de fort diamètre témoins d'une activité anthropique ancienne s'étant achevée il y a très longtemps (groupe 3), notamment dans les terres agricoles abandonnées depuis longtemps. La figure 1.14.b. montre que la situation est différente entre les îles de Lifou et Ouvéa : la proportion de peuplements ayant un bon système de régénération est plus importante à Lifou. Brinkert (2003) a effectué une structuration similaire des peuplements de Maré en cinq groupes (figure 1.14.c) où les groupes 2, 3 et 5 sont les mêmes que les groupes 1, 2, 3 établis par Steierer, y ajoutant un premier groupe de relevés vides ou presque vides, et un groupe 4 de peuplements dont la déstructuration est à mi-chemin entre celle des groupes 3 et 5. Chaque placette inventoriée dans les 12 populations de Maré (8 à 78 placettes selon les populations) étudiées a été attribuée à un groupe. Les résultats, présentés en figure 1.14.d montrent qu'à l'intérieur même des populations, les placettes de petite taille (250m<sup>2</sup>) possèdent des structures de peuplement différentes.

Au final, des conditions de surexploitation ou de régénération insuffisante ont été signalées sur 40% de la surface totale contenant le bois de santal à Maré, 18% à Lifou, et 43% à Ouvéa. Ces inventaires ne précisent pas dans quelles conditions écologiques les deux premiers groupes de peuplements sont rencontrés, mais cette étude serait intéressante à mener afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le Santal se régènerait plus facilement dans les zones ouvertes comme les jachères que dans couverts denses comme les forêts.

## **1.4. Le bois de Santal, un parfum très prisé**

### **1.4.1. Pourquoi un tel engouement pour ce produit ?**

Le bois de cœur de la majorité des arbres et arbustes du genre *Santalum* est très odorant non seulement au niveau du tronc mais aussi des racines (Moretta, 2001). Une étude sur *Santalum album* a d'ailleurs montré que le rendement en huiles essentielles des racines était de 8.43%, comparé à 5.79% pour le tronc et 3.52% pour les branches (Jayappa *et al.*, 1981). Les composés volatils se développent dans le bois de cœur au fur et à mesure que l'arbre vieillit. L'huile essentielle (ou essence) de Santal peut être extraite lorsque l'arbre a 30 ans.

L'essence de Santal est l'un des plus anciens parfums connus. Elle était déjà utilisée en Inde il y a 2300 ans (le Santal y ayant été importé), et en Egypte au XVII<sup>ème</sup> siècle avant JC.



Figure 1.15: Les multiples utilisations du bois de Santal



L'huile essentielle de Santal était employée pour l'embaumement des corps des princes de Ceylan au IX<sup>ème</sup> siècle. Les Européens l'ont découverte plus récemment (XI<sup>ème</sup> siècle) (Garnéro, 1987 ; Fluckiger *et al.*, 1879). L'essence de Santal présente aussi des vertus médicinales. Dans les thérapies occidentale et asiatique, l'essence était considérée comme un antiseptique urinaire et pulmonaire, l'essence s'éliminant essentiellement par les reins et les poumons. Actuellement, l'huile essentielle de Santal est un produit à haute valeur ajoutée (Alpha, 1997a). Elle est très prisée en parfumerie du fait de son invariabilité et de son odeur caractéristique, moyennement boisée avec une faible note animale. Ses qualités olfactives sont principalement dues à des sesquiterpénols, qui ont des points d'ébullition élevés, agissant en tant que fixateurs de parfums. Ces sesquiterpénols permettent d'abaisser la tension de vapeur de la composition totale du parfum. Les odeurs des produits plus volatils sont ainsi exhalées plus lentement (Alpha, 1997a). Elle est également utilisée dans l'industrie cosmétique pour ses propriétés anti-acnéique et anti-couperose, notamment dans la fabrication de certaines crèmes et savons (figure 1.15).

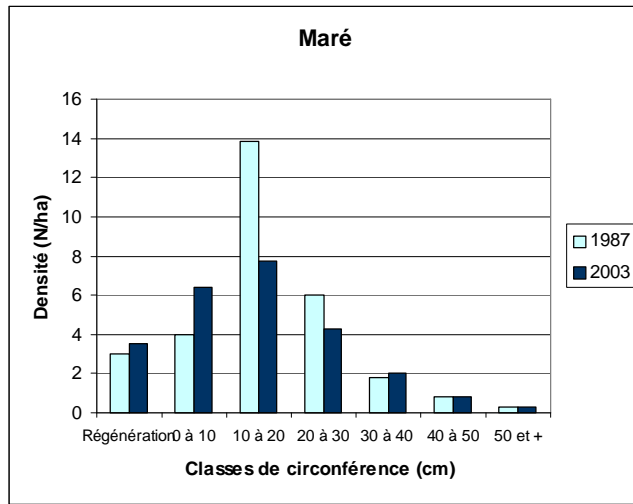
L'huile essentielle de Santal est aujourd'hui obtenue avec un rendement de 3 à 6% par distillation à la vapeur d'eau du bois pendant plusieurs jours (48 à 72h dans les distilleries indiennes). Les copeaux de Santal sont bouillis dans l'eau, la vapeur entraîne l'essence puis l'essence est séparée de l'eau par décantation.

#### **1.4.2. L'exploitation en Nouvelle-Calédonie.**

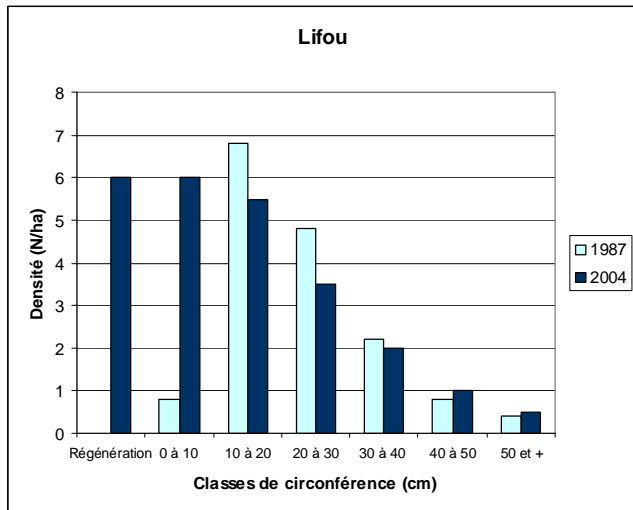
L'exploitation du bois de Santal dans le Pacifique a été particulièrement bien décrite dans l'ouvrage de Shinerberg (1967). En Nouvelle-Calédonie, l'exploitation du Santal a commencé en 1841. Les exploitants de Santal -les santaliers-, principalement des anglo-britanniques, convergaient alors vers les îles Loyauté et l'île des Pins pour charger leurs navires en bois de Santal, le troquant avec les habitants des îles contre des haches, des clous, des colliers et des armes à feu. Leur objectif était d'échanger ce précieux bois avec les chinois, qui l'utilisaient abondamment lors des cérémonies religieuses bouddhistes, contre du thé, alors devenu un breuvage national en Angleterre. Il faut savoir que l'exploitation du bois de Santal ne se réalise pas, à l'image de ce que nous connaissons en métropole, sous forme de campagnes de coupes au sein de surfaces bien précises. Il s'agit plutôt d'un système de cueillette, réalisée par le propriétaire terrien lui-même et selon les besoins financiers du moment. La course au Santal du XIX<sup>ème</sup> siècle, comparable à une véritable ruée vers l'or, fit rapidement évoluer cette simple cueillette vers une exploitation sauvage. Le premier chargement, très fructueux, quitta l'île des Pins avec 2 000 tonnes de cette précieuse essence. La prospection s'étendit

**Figure 1.16:** Comparaison des résultats entre l'inventaire de 1987 et les inventaires de 2003 (Brinkert, 2003) et 2004 (Steierer, 2004) pour les îles Loyauté. Les densités sont représentées en fonction des classes de circonférences de 10 cm prises à 1,30 m au-dessus du sol.

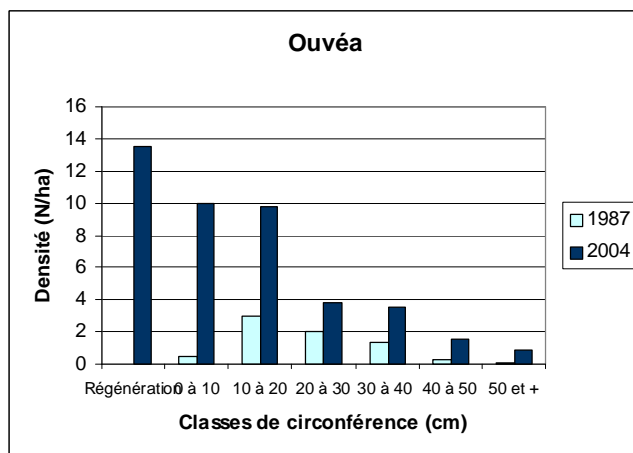
a/ Maré



b/ Lifou



c/ Ouvéa



rapidement aux îles Loyauté et à la Grande Terre jusqu'en 1865, date où le trafic cessa faute de matière première dans tout le Pacifique, et ne porta plus que sur des quantités négligeables. Une deuxième période d'exploitation commença à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, entreprise par le marché européen. Mais celle-ci cessa progressivement durant la période de l'Entre-Deux Guerres, compte tenu de la raréfaction de la matière première, mais aussi de l'émergence de produits synthétiques de substitution à l'huile de Santal dans l'industrie de la parfumerie. Entre 1940 et 1985, les quantités exploitées sur le Territoire, provenant en majorité de l'île des Pins (60% entre 1975 et 1985), furent variables et parfois excessives, malgré les réglementations (encadré 1.1). Devant le caractère spéculatif du marché du Santal et l'anarchie des coupes, les autorités du Territoire de la Nouvelle-Calédonie décidèrent en 1986 de procéder à l'inventaire des peuplements afin de dresser le bilan de la ressource et poser les conditions d'une gestion durable du potentiel du bois de Santal.

### **1.4.3. Répartition et potentiel d'exploitation**

Le positionnement des peuplements de Santal est connu par les locaux. C'est à partir de leurs connaissances, mais aussi des prospections menées par l'équipe de l'Institut Agronomique Calédonien (IAC) de Nouvelle-Calédonie que les populations de Santal sont actuellement connues en Nouvelle-Calédonie.

Sur Grande Terre, les populations ne sont présentes qu'à l'état de reliques sauf dans la population du parc de Ouen Toro, près de Nouméa, qui compte plus de 600 individus (Tassin, comm. pers.). Les autres populations comptent moins d'une centaine d'individus.

Les principaux peuplements se trouvent sur les trois îles Loyauté et à l'île des Pins, c'est donc sur ces îles qu'ont été menés les premiers inventaires par le Centre Forestier Tropical (aujourd'hui CIRAD-Forêt) : sur les îles Loyauté en 1987, et à l'île des Pins en 1988. Les résultats sont rapportés dans le rapport de Quémin (1988).

Un second inventaire a été mené sur l'île des Pins en 1994 afin de réactualiser les données et analyser l'évolution des populations de Santal, dans l'optique de déterminer un niveau d'exploitation correct. Ce second recensement a permis de conclure à une augmentation significative de la régénération à l'intérieur des secteurs inventoriés en 1988 et 1994 (Tassin *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces inventaires a aussi montré que 30 à 45 tonnes de bois de cœur pouvaient être prélevées par an aux Loyautés et à l'île des Pins sans affecter les peuplements. Les critères d'exploitabilité ont alors été fixés ainsi : (i) un périmètre de tronc (la mesure étant faite à 20 centimètres au-dessus du niveau du sol) de plus de 70 cm et une largeur d'aubier au-

## Encadré 1.1

### Principaux arrêtés législatifs applicables à l'exploitation du Santal

#### Arrêté 610 du 19 Juillet 1926 :

« Toute exploitation de souches et racines de Santal sur un Territoire indigène ne peut être permise qu'avec l'accord du Chef intéressé ».

#### Arrêté 707 du 4 Juillet 1936 :

« Les autochtones de l'île des Pins créant des plantations de Santal auront droit à des permis de coupe individuels ; ces permis porteront chaque année sur un poids de Santal en rapport avec le nombre de pieds plantés dans l'année et repris.

Le permis sera accordé sur la base de 100 kilogrammes de Santal à couper et à vendre par 50 pieds plantés et repris.

Le permis ne sera délivré que si les manquants constatés dans les plantations des années précédentes ont été remplacés par les pieds ayant repris.

Un registre sera ouvert au Service des Eaux et Forêts portant la situation annuelle des plantations de chaque autochtone et les permis de coupe délivrés ».

#### Arrêté 309 du 26 Janvier 1968

« Pour assurer à la fois la protection et la conservation des bois et forêts se trouvant sur les terrains des Réserves et leur exploitation rationnelle au bénéfice même des habitants des Réserves, le Service des Eaux et Forêts est chargé de la gestion de ces bois et forêts en accord avec les Autorités coutumières locales.

L'exploitation des bois et forêts se trouvant sur toute l'étendue de la Réserve ne peut se faire qu'avec l'accord des Autorités coutumières locales.

Les habitants des Réserves ont priorité pour l'exploitation des bois se trouvant sur la Réserve.

Les habitants des Réserves sont autorisés à couper sans paiement de taxe, pour leurs besoins personnels et dans les limites de leur Réserve, les bois nécessaires à leurs cultures, à la construction de leurs barrières, habitation et pirogues, ainsi que le bois de chauffage ?

Les habitants des Réserves peuvent obtenir des permis de coupe ordinaires et commercialiser le bois ainsi exploité.

Le montant des taxes de coupe et droits perçus à l'exploitation du bois d'une Réserve seront obligatoirement réutilisés à des travaux de reboisement ou d'enrichissement de forêt, à effectuer sur cette Réserve suivant un programme établi conjointement par le Service Forestier et les Autorités coutumières.

Les terrains de Réserve ayant fait l'objet d'un reboisement continuent à faire partie de la Réserve et ne peuvent être désaffectés de cette Réserve.

La détermination des terrains à reboiser ainsi que la définition des travaux de reboisements à effectuer sur le périmètre de la Réserve seront faites en accord avec les Autorités coutumières de la Réserve et seront précédées d'une consultation de toutes les personnes intéressées.

dessous de 3 cm, (ii) tous les arbres avec un périmètre supérieur à 100 centimètres peuvent être coupés.

Les récents inventaires de 2003 et 2004 ont suivi un nouveau cadre méthodologique (découpage plus fin des zones d'inventaire et unités d'échantillonnage moins étalées) déterminé par l'IAC (Tassin, 2003b ; Tassin, 2005a ; Tassin *et al.*, 2005). Ces inventaires ont porté sur les îles Loyauté, Maré en 2003 (Brinkert, 2003), et Lifou et Ouvéa en 2004 (Steierer, 2004). L'objectif principal était d'empêcher la surexploitation de la ressource en vérifiant que la limite de 45 tonnes par an de bois de cœur prélevé était toujours valable et que la démographie des populations n'avait pas été altérée depuis le dernier inventaire (c'est-à-dire avec un niveau admissible de régénération et une distribution harmonieuse des tailles d'arbre). Cette deuxième vague d'inventaires était d'autant plus intéressante que, s'agissant de l'exploitation, chacune des îles avait vécu un passé récent très spécifique. En effet, depuis le précédent recensement, pratiquement aucune exploitation n'avait eu lieu sur Ouvéa (sauf une coupe de 10 tonnes en 1996) (Steierer, 2004), alors qu'elle avait continué sur Lifou de manière irrégulière et mal répartie (Steierer, 2004), ainsi que sur Maré (Brinkert, 2003).

Les résultats de ces inventaires ont permis de dresser plusieurs observations :

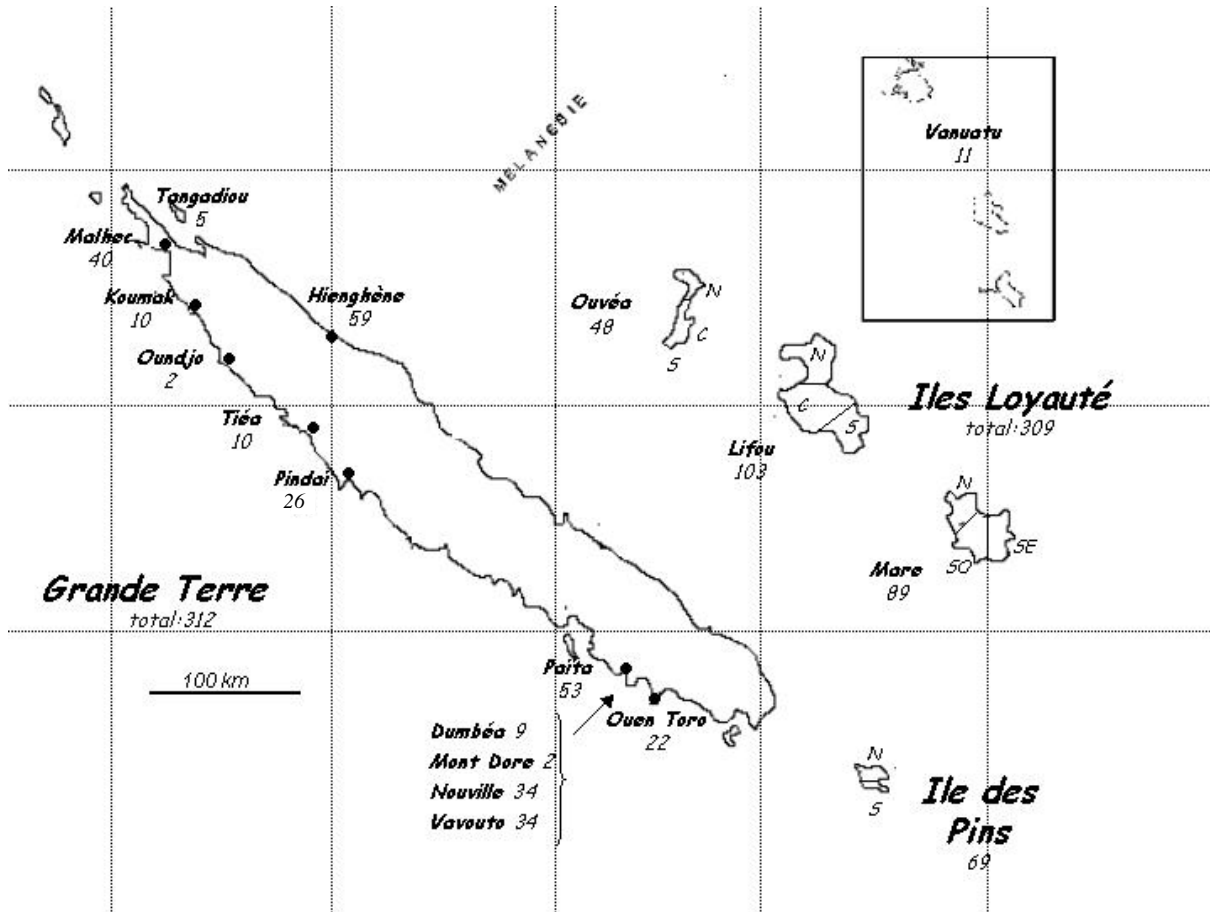
- A Maré, il n'y avait pas de différence significative des densités des peuplements de Santal entre 1987 et 2003 (figure 1.16), excepté pour la classe 10-20 cm qui était réduite en 2003 pour une raison encore inexpliquée. A Lifou et Ouvéa, les classes de faible diamètre et de régénération sont actuellement importantes, signant un bon état démographique des peuplements de ces îles.

- Les quotas annuels de récolte de bois de cœur ont été surestimés par Quémin en 1988, et devaient être revus à la baisse soit 29.2 tonnes au lieu de 45 tonnes (10 tonnes sur Maré soit 200-250 arbres, 11.5 tonnes sur Lifou soit 257 arbres, et 7.7 tonnes sur Ouvéa soit 171 arbres). Heureusement, cette surestimation des quotas durant les 15 années précédentes n'a pas eu de conséquence majeure sur la ressource. Une autre recommandation émerge de cette analyse des inventaires : celle de ne procéder aux prélèvements que sur 60% des territoires recouverts par le Santal.

La répartition actuelle est la suivante : 242 000 individus à Maré (Brinkert, 2003), 100 000 à Ouvéa (Steierer, 2004), et 127 000 à Lifou (Steierer, 2004). Sur l'île des Pins on ne dispose que des données de 1988 où le nombre d'individus estimés est d'environ 61 000 (Quémin, 1988).



**Figure 1.17:** Localisation de l'échantillonnage en Nouvelle-Calédonie et au Vanuatu. Les chiffres correspondent aux effectifs prélevés entre 1998 et 2003. N: Nord, S: Sud, E: Est, O: Ouest, C: Centre.



## 1.5. Méthode d'échantillonnage

Compte-tenu du plus grand nombre d'individus dans les Loyautés par rapport à la Grande Terre, et des objectifs de notre étude, nous avons opté pour la méthode suivante : récolter un maximum d'individus (échantillonnage exhaustif) dans les populations connues de Grande Terre, et réaliser un échantillonnage aléatoire, mais réparti sur l'ensemble de l'île, pour les îles Loyauté et l'île des Pins. Les effectifs récoltés sur l'ensemble des îles sont présentés en tableau 1.1. Afin d'avoir des tailles de populations plus comparables dans les îles Loyauté et l'île des Pins par rapport aux populations de Grande Terre, nous avons décidé de scinder ces îles très peuplées en sous-populations, sur la base de critères géographiques, d'après la localisation des individus repérés par leurs coordonnées spatiales. Les îles Loyauté ont ainsi été divisées en 3 sous-populations, et l'île des Pins, plus petite, en 2 parties (figure 1.17).

L'échantillonnage des feuilles pour les analyses génétiques s'est déroulé en plusieurs étapes, au fur et à mesure de l'avancement des connaissances sur la localisation des populations. En 1998, 17 individus ont été récoltés, 23 en 1999, 56 en 2000, 117 en 2002, et 182 début 2003. La dernière mission a eu lieu fin 2003 a permis de récolter 231 individus. Au total 626 arbres ont été échantillonnés (figure 1.17). Pour chaque arbre récolté, quelques feuilles (2 à 5) jeunes, non détériorées étaient prélevées et placées dans un sachet contenant du silicagel (produit dessiccateur), la hauteur et le diamètre étaient notés à partir de 2002, les coordonnées GPS prises à partir de 2000. L'annexe 1 présente les localisations précises des individus récoltés établies grâce à leurs coordonnées spatiales (lorsque celles-ci étaient présentes), et au logiciel MapInfo 7.8.

**Conclusion du chapitre 1:** La Nouvelle-Calédonie est un milieu insulaire avec des environnements contrastés, notamment pour les sols, les îles Loyauté étant de nature corallienne, la Grande Terre et l'île des Pins des vestiges du Gondwana et pour la pluviométrie, les Loyautés et la côte Est de Grande Terre étant beaucoup plus arrosées. Le Santal, petit arbre très prisé pour l'huile essentielle issue de son bois de cœur, se trouve aujourd'hui à l'état de relique sur Grande Terre, et est beaucoup plus présent sur les Loyautés. Les données que nous allons analyser dans cette thèse nous permettront d'alimenter la réflexion sur les déterminants de la diversité au sein de l'espèce.





## **CHAPITRE 2**

### ***Diversité et structure génétiques sur la base de marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques***



Ce chapitre a pour objectif de comprendre l'impact de certaines forces évolutives - principalement la dérive et la migration-, sur des caractères neutres -les microsatellites chloroplastiques et nucléaires-, dans un milieu insulaire : la Nouvelle-Calédonie. Il permet notamment d'évaluer les flux de gènes, la différenciation et la structuration des populations, l'impact de la dérive sur la diversité, et de dresser des hypothèses quant à la colonisation du Santal dans l'archipel calédonien. La problématique de cette partie a fait l'objet d'un article paru dans *Molecular Ecology*, d'une note parue dans *Molecular Ecology Notes*, et d'un article sous presse dans *Conservation Genetics*, joints en annexes 3, 4 et 5:

- Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A, Bouvet JM (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular Ecology*, **14** (7), 1979-1989
- Bottin L, Vaillant A, Sire P, Cardi C, Bouvet J M (2005) "Isolation and Characterization of microsatellite loci in *Santalum austrocaledonicum*, Santalaceae", *Molecular Ecology Notes*, **5**(4), 800-802.
- Bottin L, Tassin J, Nasi R, Bouvet JM. Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia. *Conservation Genetics*, sous presse.

Nous en reprendrons la réflexion générale sans détailler les éléments déjà décrits dans les articles (en particulier les références) et apporterons des éléments complémentaires, notamment l'analyse de possibles goulots d'étranglement.



## 2.1. Quels sont les attendus sur la diversité génétique de *Santalum austrocaledonicum* en Nouvelle-Calédonie ?

Les milieux insulaires sont le siège de forces évolutives exacerbées. Du fait de l'existence de barrières géographiques, les flux géniques entre îles sont restreints, créant de fortes différenciations entre elles au moins aux loci neutres. D'autre part, à l'intérieur des petites îles, les populations ont souvent une diversité faible liée à un événement de fondation récent, à l'isolement vis-à-vis de leur population source, et aux processus stochastiques tels que la dérive dus à la faible taille des populations (Carlquist, 1980 ; Barrett, 1996 ; Frankham, 2002 ).

Chez *S. austrocaledonicum*, la diversité génétique mesurée par les marqueurs neutres devrait ainsi être fortement influencée par le caractère insulaire de la Nouvelle-Calédonie, avec une différenciation forte entre les îles de l'archipel. Compte tenu de la dissémination des graines par des oiseaux, pouvant parcourir la distance entre les îles, il apparaît probable qu'un flux de gènes par graines, si faible soit-il, existe encore entre les îles, et tendrait à limiter ce processus de différenciation. En ce qui concerne d'éventuels événements de fondation, nous n'avons à ce jour aucune donnée sur l'historique de la colonisation du Santal en Nouvelle-Calédonie. Tout au plus sait-on que son origine serait australienne de par sa proximité phylogénétique avec *S. obtusifolium* (cf chapitre 1), mais la datation de l'arrivée sur l'archipel est encore inconnue.

On s'attend aussi à une différenciation entre les populations de Grande Terre de par leur éloignement géographique, mais cette différenciation devrait être moins importante qu'entre îles car la fragmentation sur Grande Terre, due à l'exploitation intensive du bois de Santal (en faisant l'hypothèse qu'il existait une continuité de populations avant l'exploitation), est sur une échelle historique beaucoup plus récente que celle des temps géologiques ayant vu la surrection des îles Loyauté.

Un dernier aspect, étudié de façon marginale au cours de cette thèse, et qui devrait influencer la structuration génétique du Santal au niveau intra-population est sa capacité de drageonner à partir de bourgeons adventifs des racines. Les arbres issus de drageons étant des clones de leur arbre-mère, la présence de nombreux arbres issus de ce mode de reproduction au sein d'une population devrait engendrer une sous-structuration.



## 2.2. Le choix des marqueurs microsatellites

- **Microsatellites nucléaires**

Les marqueurs microsatellites nucléaires font partie des marqueurs mendéliens les plus puissants pour révéler du polymorphisme et leur utilisation en génétique des populations est croissante depuis les années 80 (Jarne et Lagoda, 1996). Ci-dessous, nous présentons un tableau comparatif des principales caractéristiques des microsatellites nucléaires par rapport à deux autres marqueurs couramment utilisés en biologie des populations : les allozymes et les RAPDs (extrait de Jarne et Lagoda, 1996).

Caractéristiques	Allozymes	RAPDs	Microsatellites nucléaires
Codominance	oui	non	oui
Neutralité	douteuse	oui	oui
Embryon/jeune pouvant être marqué	rarement	oui	oui
Adulte pouvant être marqué	oui	oui	oui
Nombre de loci variables analysés	10-50	10-100	5-20
Nombre d'allèles par locus	1-5	2	1-50
Information moléculaire (structure, mutation)	rarement	rarement	disponible
Nombre d'individus pouvant être marqués par unité d'effort	1	1	0.2- 0.4
Coût relatif par individu	1	1	3-4

Les séquences microsatellites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) sont des portions d'ADN constituées de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétranucléotidiques, et dont le nombre de motifs peut aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Les microsatellites sont très abondants dans le génome des organismes eucaryotes ; chez les végétaux supérieurs en particulier, il y aurait en moyenne un microsatellite dinucléotidique tous les 30 à 100 kilo-bases (Morgante, 1993).

Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt des microsatellites en génétique réside dans leur polymorphisme extrêmement élevé. Le polymorphisme concerne le nombre des unités de répétition qui constituent la séquence microsatellite et serait dû au « glissement » de la polymérase lors de la réplication des chromosomes. La séquence microsatellite est, de plus, soumise aux mécanismes d'évolution rapides des séquences répétées en tandem, tels que les *crossing-over* asymétriques. Les taux de mutation des microsatellites (approximativement





$10^{-3}$ ) sont très élevés comparés à ceux d'autres séquences de l'ADN génomique, ce qui explique que les microsatellites sont très peu présents dans les séquences codantes, car trop instables et fortement contre-sélectionnés (Jarne et Lagoda, 1996).

L'utilisation des microsatellites a malgré tout quelques inconvénients, notamment l'existence d'allèles nuls et éventuellement d'homoplasie, l'un comme l'autre pouvant conduire à des interprétations erronées concernant la structuration des populations (Jarne et Lagoda, 1996) ; ou encore les problèmes de sous-estimation du  $F_{st}$  dans les populations très divergentes (Balloux et Lugon-Moulin, 2002).

- **Microsatellites chloroplastiques**

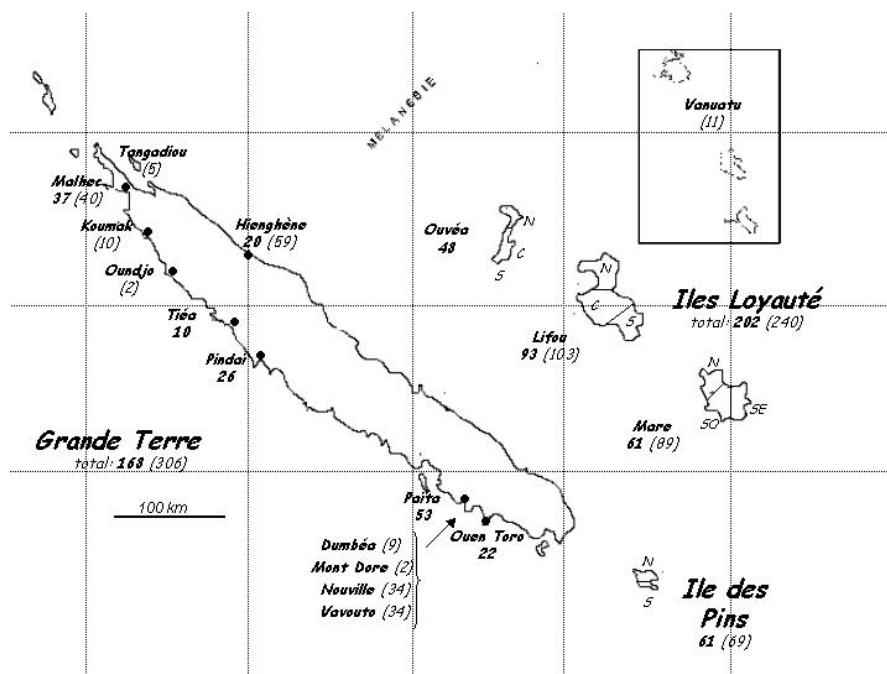
Des séquences microsatellites ont également été identifiées dans le génome chloroplastique de diverses espèces d'Angiospermes et de Gymnospermes (Vendramin, 1996) et ont fait l'objet de nombreuses études de diversité génétique (Marshall *et al.* 2002 ; Gómez *et al.* 2003 chez des Gymnospermes ; Palme & Vendramin 2002 ; Collevatti *et al.* 2003 ; Grivet & Petit 2003 pour des Angiospermes). Ces microsatellites chloroplastiques sont formés par la répétition d'un motif, le plus souvent poly-A, le polymorphisme de ces séquences concerne donc le nombre de nucléotides « A ». Ils possèdent les mêmes propriétés que les microsatellites nucléaires, à savoir un fort taux de mutation expliquant leur absence dans les régions codantes, et la possibilité d'homoplasie. Par contre, le génome chloroplastique étant haploïde, il ne subit pas de recombinaison, rendant ce marqueur approprié pour des études phylogéographiques. L'ADN chloroplastique étant plus conservé que l'ADN nucléaire, le taux de mutation des microsatellites chloroplastiques est inférieur à celui des microsatellites nucléaires. Les microsatellites chloroplastiques ont donc en général un polymorphisme moins important que les microsatellites nucléaires et permettent de révéler des histoires évolutives plus anciennes que les microsatellites nucléaires. D'autre part, le génome chloroplastique est hérité maternellement chez la plupart des Angiospermes (nous avons fait cette hypothèse dans le cas du Santal) et disséminé par les graines, permettant d'étudier les contributions relatives des flux de gènes par graines et par pollen (Deguilloux, 2004).

Les informations différentes et complémentaires apportées par les marqueurs microsatellites nucléaires et chloroplastiques, et leur pertinence dans le cadre de notre étude, nous ont conduit à mener notre étude de diversité génétique par la double approche de ces deux types de marqueurs. Ce choix a été aussi motivé par les résultats décevants d'une première

**Tableau 2.1:** Répartition de l'échantillonnage selon les populations et sélection des individus pour l'analyse génétique. Pour l'analyse génétique, le nombre d'individus minimum par population est fixé à 10. Le tableau présente le nombre d'individus génotypés mais exclus de l'analyse : (i) ceux n'ayant pas amplifié et (ii) ceux considérés comme des drageons, donc des clones d'autres individus.

	Nb. individus récoltés	Nb. individus n'ayant pas amplifié	Nb. individus considérés comme drageons	Nb. individus restants pour l'étude
Ouen Toro	22	0	0	22
Païta	53	0	0	53
Dumbéa	9	-	-	-
Mont Dore	2	-	-	-
Nouvelle	34	34	-	-
Vavouto	34	34	-	-
Pindaï	26	0	0	26
Tiéa	10	0	0	10
Oundjo	2	-	-	-
Koumak	10	0	5	-
Malek	40	0	3	37
Tagadiou	5	-	-	-
Hienghène	59	14	25	20
<b>Total Grande Terre</b>	<b>306</b>	<b>82</b>	<b>33</b>	<b>168</b>
<b>Ile des Pins</b>	<b>69</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>61</b>
Maré	89	0	28	61
Lifou	103	0	10	93
Ouvéa	48	0	0	48
<b>Total Loyautés</b>	<b>240</b>	<b>0</b>	<b>38</b>	<b>202</b>
Vanuatu	11	0	11	-
<b>Total</b>	<b>626</b>	<b>82</b>	<b>90</b>	<b>431</b>

**Figure 2.1:** Répartition géographique de l'échantillonnage. En gras : les individus analysés statistiquement, entre parenthèses et en italique : le total des individus récoltés par localité.



approche par la technique de PCR-RFLP (Demesure *et al.*, 1995) qui n'avait révélé aucun polymorphisme.

### **2.3. Matériel et méthodes d'analyse des microsatellites chloroplastiques et nucléaires**

Les caractéristiques des populations analysées sont présentées en tableau 1.1, et la méthode d'échantillonnage en § 1.5. du chapitre précédent. Les îles Loyauté ainsi que l'île des Pins ont été scindées en respectivement 3 et 2 populations afin d'en faire des sous-populations de taille plus comparable à celles de Grande Terre. Ces sous-populations ont été définies sur la base de la localisation géographique des individus établie avec le logiciel Mapinfo 7.8. (voir annexe 1).

L'échantillonnage total est composé de 626 individus (tableau 2.1, figure 2.1), dont 385 seulement récoltés avant l'analyse des microsatellites chloroplastiques. Parmi ces 626 individus, 11 proviennent du Vanuatu, l'analyse de ces individus avait pour objectif de comparer leur diversité à celle de l'archipel calédonien.

La méthode d'analyse de marqueurs microsatellites est basée ici sur la technique d'amplification de fragments d'ADN (d'une centaine à quelques milliers de paires de bases) à l'aide d'amorces nucléotidiques et d'une enzyme, la Taq polymérase (méthode dite de PCR : Polymerase Chain Reaction). Cette méthode permet, après migration des fragments amplifiés sur un gel d'acrylamide soumis à un champ électrique, de déceler des mutations de type insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotides (une description plus complète des matériels et méthodes est présentée dans les articles et la note en annexes 3, 4 et 5).

- **Microsatellites nucléaires**

Pour le génome nucléaire, il est nécessaire de définir des amorces spécifiques à l'espèce étudiée. Chez *S. austrocaledonicum*, huit loci microsatellites nucléaires révélant du polymorphisme ont été isolés, ils ont été nommés : mSaCIRE09, mSaCIRH09, mSaCIRG01, mSaCIRH11, mSaCIRG10, mSaCIRF04, mSaCIRF10 et mSaCIRH10. La mise au point de ces paires d'amorces est présentée dans l'article Bottin *et al.* (2005b), joint en annexe 4.

- **Microsatellites chloroplastiques**

Du fait d'un faible taux de mutation et de recombinaison du génome chloroplastique (Olmstead et Palmer, 1994), il est possible de définir des amorces dites « universelles » d'une



vingtaine de paires de bases (pb) qui permettent l'amplification spécifique d'une même zone génique chez un grand nombre d'espèces d'Angiospermes. Nous avons testé 33 de ces amorces sur *Santalum austrocaledonicum* : 7 couples d'amorces mises au point par Weising et Gardner (CCMP) sur le tabac (1999), 20 couples d'amorces mises au point sur le tabac par Ishii *et al.* (2001) (NTCP) et 6 mises au point sur le riz par Bryan *et al.* (1999) (Rct). Seules 3 amorces sur les 33 analysées ont révélé du polymorphisme : CCMP3, CCMP5 et NTCP9.

## 2.4. Sélection des individus analysés

Les analyses génétiques ont conduit à éliminer un certain nombre d'individus, à commencer par ceux n'ayant pas amplifié. Ayant observé que ces individus n'amplifiaient pour aucun locus et provenaient dans tous les cas d'une même récolte, nous avons conclu que les feuilles échantillonnées avaient été mal séchées ou mal conservées avant l'extraction, conduisant à une dégradation de leur ADN.

Une fois ôtés les individus n'amplifiant pas et ceux issus de populations ayant moins de 10 individus (limite arbitraire), il restait pour les microsatellites nucléaires 541 individus analysables, et pour les microsatellites chloroplastiques, 250 individus (voir tableau 2.1 pour la répartition des individus exclus de l'étude).

Le Santal se reproduisant par drageonnage (Quémin, 1988), la récolte d'individus proches les uns des autres faisait courir le risque de récolter les individus issus d'un même clone. Notons qu'en Nouvelle-Calédonie, à notre connaissance, il n'existe pas (et n'a pas existé) de pépinière pratiquant la multiplication végétative du Santal. Le drageonnage est donc la seule source possible de clones. Afin d'éviter ce problème de clones, nous avons donc choisi d'exclure de l'analyse tous les individus (sauf un) de même génotype nucléaire (les microsatellites nucléaires révélant plus de diversité que les microsatellites chloroplastiques) situés à moins de 100 mètres les uns des autres. Nous avons d'abord identifié les génotypes similaires avec la méthode de neighbour-joining pour chaque population en utilisant le logiciel Darwin 4-4 (Perrier et Jacquemoud-Collet, 2003). Puis nous avons examiné leur position sur des cartes géographiques, leur positionnement ayant été effectué avec le logiciel Mapinfo 7.8. Sur les 541 individus de départ étudiés pour les microsatellites nucléaires, 90 ont ainsi fortement été suspectés être des clones et ont été éliminés. En outre, les individus récoltés au Vanuatu étaient tous similaires, et ne possédant pas les informations de leur lieu de récolte et leurs coordonnées géographiques, nous avons décidé de les ôter de l'étude. Ces 90 clones



potentiels correspondaient à 32 individus sur les 250 étudiés pour les microsatellites chloroplastiques, et ont donc aussi été ôtés de l'étude (voir tableau 2.1). Cette analyse nous a ainsi montré que le drageonnage semblait avoir une grande importance chez *S. austrocaledonicum*. En revanche, il n'est pas possible de quantifier avec nos données la proportion précise de drageonnage au sein de l'espèce. En effet les modes d'échantillonnage étaient différents selon la taille des populations, aboutissant à récolter, en principe, davantage de clones dans les petites populations que sur les îles Loyauté. D'autre part les récoltes suivant 2003 étaient plus sélectives, visant à ne récolter que des arbres éloignés de plus de 20 mètres afin d'exclure d'éventuels clones, ce qui n'était pas le cas des récoltes précédentes. Une étude plus poussée du phénomène de drageonnage chez cette espèce constitue une perspective de recherche pour l'avenir. Elle pourrait être accomplie par l'analyse génétique d'individus issus d'un échantillonnage exhaustif dans des populations avec des degrés de perturbation variés.

## 2.5. Les paramètres de génétique des populations

### 2.5.1. Paramètres usuels de description de la diversité génétique.

- **Microsatellites nucléaires**

Pour les microsatellites nucléaires, issus d'un génome diploïde, nous avons calculé, en utilisant GENETIX 4.03 (Belkir *et al.*, 2001): les fréquences alléliques (fréquences dans la population des différents allèles au locus considéré), la richesse allélique  $A$  (nombre moyen d'allèles par locus), l'hétérozygotie observée  $H_o$  (proportion observée d'hétérozygotes dans une population) et attendue  $H_e$  (proportion attendue d'hétérozygotes sous un régime de Hardy Weinberg) (Nei, 1978).

L'indice de diversité génétique  $H_e$  sans biais de Nei (1978) est calculé selon la formule :

$$H_e = \sum_{k=1}^r h_k / r \quad \text{avec} \quad h = 2n(1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$$

- où
- $h_k$  est la valeur de  $h$  au  $k^{\text{ième}}$  locus ;
  - $r$  est le nombre de locus ;
  - $n$  est la taille de l'échantillon ;
  - $x_i$  est la fréquence de l'allèle  $i$  au locus  $k$  dans l'échantillon.

- **Microsatellites chloroplastiques**

Pour les microsatellites chloroplastiques, issus d'organites haploïdes, les paramètres caractérisant la diversité sont différents. Nous avons calculé le nombre moyen





d'haplotypes - aussi appelés chlorotypes pour des données issues du génome chloroplastique - par population :  $C_{cp}$ , ainsi que la diversité haplotypique :  $H_{cp}$ , qui est équivalente à l'hétérozygotie attendue lorsque l'on dispose de données diploïdes.  $H_{cp}$  est définie comme la probabilité que deux haplotypes d'une même population soient différents et est estimée

comme suit (Nei, 1987) :

$$H_{cp} = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

où  $n$  est le nombre de copies de l'allèle dans la population,  $k$  est le nombre d'haplotypes, et  $p_i$  est la fréquence de l'haplotype  $i$  dans la population. Ces paramètres ont été estimés avec le logiciel ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 1992).

### 2.5.2. F-statistiques

La différenciation génétique des populations est usuellement abordée par les F-statistiques ( $F_{st}$ ,  $F_{is}$  et  $F_{it}$ ) décrites initialement par Wright (1969), corrigées par Weir et Cockerham (1984) :

---

Wright Weir & Cockerham

---

$F_{it}$	$F = 1 - [C/(A+B+C)]$	estime la corrélation des gènes chez les individus sur l'ensemble de l'échantillon
$F_{is}$	$f = 1 - [C/(B+C)]$	estime la corrélation des gènes chez les individus dans une population
$F_{st}$	$\theta = A/(A+B+C)$	estime la corrélation des gènes entre individus dans une population par rapport à l'ensemble des populations

---

La relation entre ces trois paramètres est  $f = (F - \theta) / (1 - \theta)$ .

Les paramètres A, B et C sont issus de l'analyse de variance des fréquences pour un allèle  $i$  donné :

- $A_i$  : composante inter-population
- $B_i$  : composante, entre individus à l'intérieur de chaque population
- $C_i$  : composante entre gamètes à l'intérieur de chaque individu

Les calculs de A, B et C sont détaillés dans Weir & Cockerham (1984) et Weir (1990).

L'estimation de  $\theta$  pour un locus tous allèles  $i$  confondus est donnée selon Weir & Cockerham

$$F_{st} = \frac{\sum_i (A_i)}{\sum_i (A_i + B_i + C_i)}$$

Dans notre étude, nous avons calculé, à l'aide du logiciel ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 1992), pour les **microsatellites nucléaires**, le déficit local en hétérozygotes  $F_{is}$  au niveau de



chaque population. Nous avons aussi calculé l'indice de fixation  $F_{st}$  pour les **microsatellites nucléaires et chloroplastiques** qui mesure dans un cas comme dans l'autre la différenciation entre sous-populations. L'indice  $F_{st}$  a été calculé globalement entre toutes les populations, mais aussi entre paires de populations afin de connaître leurs distances génétiques deux à deux, et entre des groupes de populations prédéfinis : nous avons ainsi testé la différenciation entre les groupes « îles Loyauté » et « Grande Terre / île des Pins », et la différenciation entre populations à l'intérieur de ces groupes. Toutes les procédures de tests sont données dans les articles en annexes 3, 4 et 5.

### 2.5.3. Test de Mantel

Afin d'analyser la relation entre le degré de différenciation génétique et la distance géographique, nous avons appliqué le test de Mantel (1967) à deux niveaux : entre populations et intra-population.

- Au niveau « inter-population », nous avons mené les tests de Mantel sur les données des **microsatellites nucléaires** avec le logiciel GENEPOP 3.4 (Raymond et Rousset, 1995)

où la procédure consiste à déterminer la corrélation entre l'estimateur  $\frac{F_{ST}}{(1 - F_{ST})}$  et le

logarithme de la distance euclidienne entre paires de localités (Rousset, 1997), utilisant comme test statistique le coefficient de Spearman, avec 5000 permutations. Compte tenu de la géographie de l'archipel, les tests paraissent plus pertinents à mener entre populations sur la Grande Terre et entre populations des Loyautés.

- Au niveau « intra-population » nous avons mené le test sur les **microsatellites nucléaires** avec le logiciel Xlstat (Addinsoft, 1995) en menant 1000 permutations, dans les populations où les coordonnées spatiales étaient disponibles. La distance génétique choisie est

le simple matching, calculée avec DARWIN 5 (Perrier, 2003) :  $d_{ij} = \frac{u}{m + u}$ , où  $d_{ij}$  est la

distance entre les unités  $i$  et  $j$ ,  $u$  le nombre d'allèles non partagés au même locus,  $m$  le nombre d'allèles communs au même locus. Nous avons aussi mené ce test avec les données issues des **microsatellites chloroplastiques** dans les populations où le test semblait pertinent au vu de la répartition des chlorotypes.

### 2.5.4. Construction arborée

Pour visualiser la différenciation entre populations, on utilise généralement des arbres basés sur les distances génétiques dont la robustesse des nœuds peut être testée par bootstraps.



Parmi les différentes méthodes de construction arborée, nous avons utilisée celle du neighbour-joining (Saitou et Nei, 1987), et la méthode de distance de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza et Edwards, 1967) afin de construire ces arbres à la fois pour les données **nucléaires et chloroplastiques**. Tous les logiciels et méthodes utilisés sont présentés dans les articles (Bottin *et al.*, 2005 a et b).

### 2.5.5. Test d'un goulot démographique

Nous avons mené un test de détection de goulot démographique à partir des données des **microsatellites nucléaires** en utilisant le logiciel Bottleneck (Cornuet et Luikart, 1996), non présenté dans les articles joints en annexes. Ce test vise à détecter un goulot démographique, c'est à dire une diminution drastique du nombre d'individus d'une population, lors d'un événement de colonisation par exemple (il s'agit alors d'un effet de fondation), qui engendre par la suite des modifications des valeurs des paramètres génétiques. Le principe de ce test est le suivant : dans une population récemment soumise à une réduction de sa taille efficace, le nombre d'allèles ( $k$ ) diminue, de même que la diversité génétique ( $H_o$ , hétérozygotie observée) aux loci polymorphes. Mais le nombre d'allèles diminue plus rapidement que la diversité génétique. Ainsi, dans une population récemment soumise à un goulot démographique, la diversité génétique observée ( $H_o$ ) est plus forte que la diversité génétique attendue à l'équilibre ( $H_{eq}$ ) qui est calculée à partir du nombre observé d'allèles ( $k$ ), sous l'hypothèse que la population conserve une taille constante (Luikart *et al.* 1998). Savoir si une population a subit récemment un goulot d'étranglement revient donc à tester l'hypothèse que  $H_o > H_{eq}$ . Ceci suppose de connaître le modèle mutationnel des loci étudiés. Dans le cas des microsatellites nucléaires, le modèle le plus adapté est le TPM (Two Phase Model, modèle de mutation à deux phases) qui est composé de 90 à 95% de mutations « pas par pas » (SMM, Stepwise Mutation Model) et 5 à 10% de mutations avec des étapes multiples (IAM, Infinite Allele Model) (Luikart *et al.*, 1998). Le test utilisé est celui de Wilcoxon, test puissant permettant de traiter un nombre de loci faible (à partir de 4 loci) et n'importe quel nombre d'individus (toutefois 15 à 40 individus et 10 à 15 loci polymorphes sont recommandés pour avoir un test puissant).

### 2.5.6. Comparaison des flux de pollen et de graines

Enfin, possédant les données **nucléaires et chloroplastiques**, nous avons fait l'hypothèse que le chloroplaste avait une transmission maternelle comme dans la majorité des Angiospermes

**Tableau 2.2 :** Paramètres de diversité génétique pour les populations *S. austrocaledonicum* basés sur les microsatellites nucléaires (indices :nuc) et les microsatellites chloroplastiques (indice :cp).

$N$ : nombre d'individus,  $A_{nuc}$ : nombre d'allèles par locus,  $H_{onuc}$ : hétérozygotie observée,  $H_{enuc}$ : hétérozygotie attendue,  $F_{is}$ : indice de fixation,  $C_{cp}$ : nombre de chlorotypes (=hapotypes) par population,  $H_{cp}$ : diversité chloroplastique.

P-values: ns:  $P > 0.05$ , \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  (P-values ajustées avec la procédure de Bonferroni)

Population	microsatellites nucléaires					microsatellites chloroplastiques		
	$N_{nuc}$	$A_{nuc}$	$H_{onuc}$	$H_{enuc}$	$F_{is}$	$N_{cp}$	$C_{cp}$	$H_{cp}$
Ouentoro	22	5.13	0.66 (0.11)	0.65 (0.12)	0.0 ns	21	2	0.10(0.08)
Pindai	26	7.5	0.66 (0.23)	0.72 (0.20)	0.09 ***	16	3	0.24(0.14)
Malhec	37	6.25	0.69 (0.23)	0.66 (0.21)	-0.02 ns	9	2	0.39(0.16)
Paita	53	6.75	0.61 (0.17)	0.62 (0.17)	0.03 ***	11	3	0.65(0.11)
Hienghène	20	5.25	0.64 (0.19)	0.59 (0.12)	-0.05 ns	11	1	0.00(0.00)
Tiéa	10	6.25	0.75 (0.22)	0.70 (0.22)	-0.03 ns	9	3	0.56(0.17)
<b>GrandeTerre168</b>	<b>16</b>	<b>0.69 (0.16)</b>	<b>0.79 (0.18)</b>	<b>0.17 ***</b>	<b>77</b>	<b>8</b>	<b>0.70(0.04)</b>	
Ile des Pins N	26	7.88	0.74 (0.14)	0.71 (0.15)	-0.01 ns	14	3	0.60 (0.08)
Ile des Pins S	35	7.63	0.69 (0.20)	0.67 (0.20)	-0.01 ns	18	3	0.46 (0.13)
<b>Ile des Pins</b>	<b>61</b>	<b>10.25</b>	<b>0.74 (0.19)</b>	<b>0.71 (0.17)</b>	<b>0.0 ns</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0.57(0.07)</b>
Lifou N	36	2.75	0.25 (0.22)	0.33 (0.25)	0.27 ***	20	3	0.73(0.06)
Lifou M	42	4.13	0.32 (0.20)	0.40 (0.22)	0.21 **	26	4	0.73(0.04)
Lifou S	15	2.13	0.25 (0.26)	0.25 (0.26)	0.06 ns	10	3	0.38(0.18)
<b>Lifou</b>	<b>93</b>	<b>4.5</b>	<b>0.40 (0.30)</b>	<b>0.42 (0.21)</b>	<b>0.25 ***</b>	<b>56</b>	<b>8</b>	<b>0.70(0.04)</b>
Maré N	21	1.75	0.02 (0.04)	0.07 (0.13)	0.67 ***	15	3	0.45(0.13)
Maré SW	18	1.38	0.06 (0.13)	0.12 (0.24)	0.47 *	10	1	0.00(0.00)
Maré SE	22	1.38	0.01 (0.02)	0.03 (0.06)	0.66 *	10	1	0.00(0.00)
<b>Maré</b>	<b>61</b>	<b>2</b>	<b>0.16 (0.35)</b>	<b>0.14 (0.21)</b>	<b>0.62 ***</b>	<b>35</b>	<b>3</b>	<b>0.21(0.09)</b>
Ouvéa N	21	2.88	0.23 (0.19)	0.28 (0.22)	0.21 **	11	2	0.18(0.14)
Ouvéa M	15	2.5	0.3 (0.25)	0.28 (0.22)	-0.03 ns	5	2	0.60(0.18)
Ouvéa S	12	2.37	0.28 (0.26)	0.29 (0.23)	0.10 ns	2	1	0.00(0.00)
<b>Ouvéa</b>	<b>48</b>	<b>3.63</b>	<b>0.39 (0.28)</b>	<b>0.37 (0.17)</b>	<b>0.14 *</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	<b>0.45(0.12)</b>
<b>Total</b>	<b>431</b>	<b>15.37</b>	<b>0.45 (0.10)</b>	<b>0.66 (0.19)</b>	<b>0.33***</b>	<b>218</b>	<b>15</b>	<b>0.83(0.01)</b>

(Conde *et al.* 1979 ; Neale *et al.*, 1989) et nous avons estimé le ratio du flux de pollen par rapport au flux de graines ( $R_{p/g}$ ) par la formule suivante (Ennos (1994)) :

$$R_{p/g} = \frac{A(1 + F_{is}) - 2C}{C} , \text{ où } A = (1/F_{stnuc} - 1) \text{ et } C = (1/F_{stcp} - 1) \text{ (} F_{stnuc} = F_{st} \text{ pour les microsattellites nucléaires, } F_{stcp} = F_{st} \text{ pour les microsattellites chloroplastiques).}$$

## 2.6. Une diversité et une structuration génétiques des îles complexes partiellement conformes aux attendus en milieu insulaire

### 2.6.1. Diversité génétique au sein de l'archipel

L'un des principaux attendus dans un système insulaire est l'existence de différences de diversité entre les îles, qui de par leur structure géographique (taille), leur isolement et leur histoire géologique, peuvent présenter des patrons de diversité variés.

- C'est ce que l'on observe pour les **microsattellites nucléaires** avec des hétérozygoties observées ( $H_{onuc}$ ) variant fortement d'une île à l'autre, en liaison avec une grande variation du nombre moyen d'allèle par locus ( $A_{nuc}$ ) (tableau 2.2). L'île la moins diversifiée est Maré ( $A_{nuc} = 2$ ,  $H_{onuc} = 0.16$ ) et la plus diversifiée est Grande Terre ( $A_{nuc} = 16$ ,  $H_{onuc} = 0.69$ ). On s'attend à ce que la diversité soit plus faible dans les îles de petite taille, car la taille des populations y est limitée et les possibilités de diversification moindres. Ce principe est vérifié pour les Loyautés qui apparaissent en effet moins diversifiées (pour Lifou la plus diversifiée,  $A_{nuc} = 4.5$ ), que sur la grande île de Grande Terre (en moyenne par population  $A_{nuc} = 6.2$ ). Cependant l'île des Pins ne répond pas à ce principe, car malgré sa petite surface, sa diversité au niveau populationnel est la plus élevée de l'archipel (île des Pins nord  $A_{nuc} = 0.74$ , île des Pins Sud,  $A_{nuc} = 0.69$ ). Cette particularité s'explique par sa proximité de Grande Terre (70 km), et leur raccordement au cours de la dernière glaciation (cf. chapitre 1), qui a permis de maintenir un flux génétique continu entre elles.

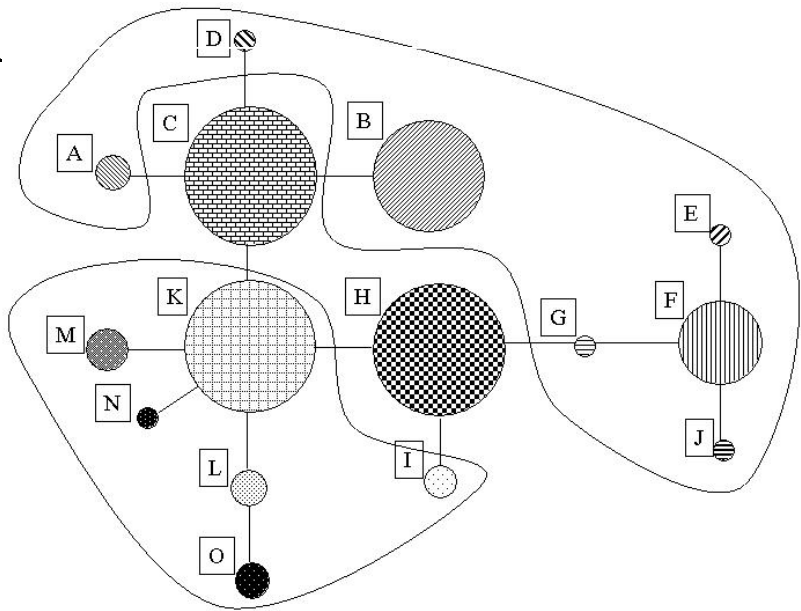
- Concernant les **microsattellites chloroplastiques**, la variation de la diversité génétique entre îles est abordée par l'étude des chlorotypes sur les différentes îles. Dans notre étude, les 3 loci ont révélé 3 allèles pour le locus CCMP3, 4 pour CCMP5 et 4 pour NTCP9. La combinaison de ces 11 allèles donne 15 chlorotypes dans toute la population (figure 2.2.a), distants d'une ou plusieurs mutations comme représenté en figure 2.2.b. Leur faible nombre, comparativement à tous les génotypes possibles avec les microsattellites nucléaires, permet de les représenter de façon simple sous forme de diagrammes par population (figure 2.2.c). Le



**Figure 2.2.a :** Définition des chlorotypes (en paires de bases).

Chlorotype	CCMP3	CCMP5	NTCP9
A	110	112	293
B	110	113	293
C	110	114	293
D	110	115	293
E	109	112	294
F	109	113	294
G	110	113	294
H	110	114	294
I	110	115	294
J	109	113	295
K	110	114	295
L	111	114	295
M	110	115	295
N	110	114	296
O	111	114	296

**Figure 2.2.b:** Liens entre les différents chlorotypes. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus possédant ce chlorotype. Un trait équivaut à une mutation. Les chlorotypes encadrés en haut sont trouvés uniquement sur les Loyautés, ceux encadrés en bas sont trouvés uniquement sur Grande Terre.



**Figure 2.2.c:** répartition des chlorotypes sur les différentes îles. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'individus échantillonnés.

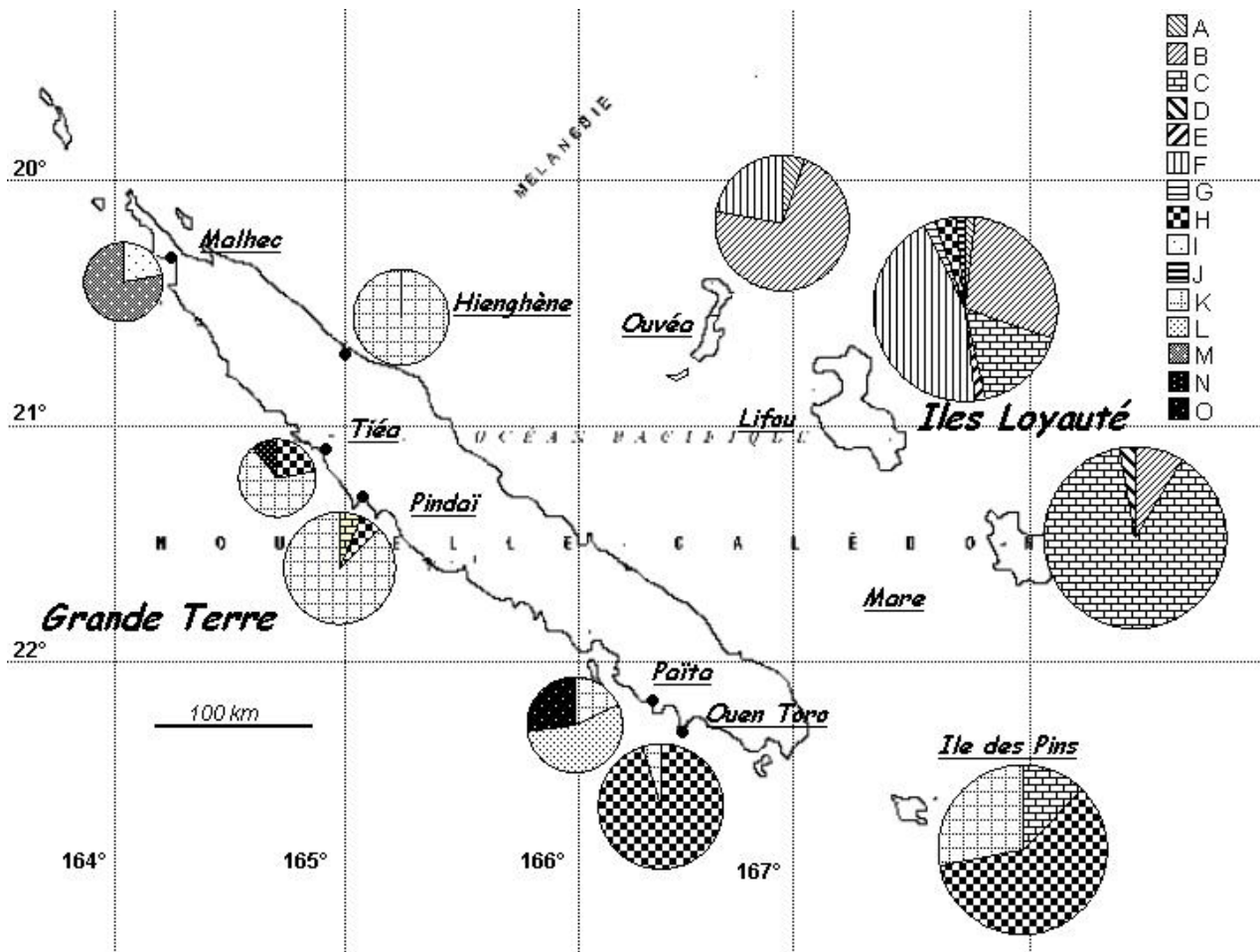


tableau 2.2 et la figure 2.2.c montrent que les îles avec la plus grande diversité chloroplastique sont Grande Terre et Lifou avec 8 chlorotypes, alors qu'Ouvéa, Maré et l'île des Pins n'en possèdent que 3. Ce résultat se retrouve au travers de la diversité chlorotypique (tableau 2.2.), plus forte sur Grande Terre et Lifou que sur les autres îles. Comme pour les microsatellites nucléaires, l'attendu d'une plus faible diversité sur les petites îles relativement aux grandes n'est pas vérifié pour toutes les îles, car on observe une diversité aussi grande à Lifou que sur Grande Terre ( $C_{cp} = 8$ ) malgré leur différence de taille. La forte diversité chloroplastique de Lifou (aussi associée à une forte diversité de microsatellites nucléaires comparativement aux autres îles Loyauté) pourrait s'expliquer par sa position géographique centrale entre Maré et Ouvéa. Lifou, île la moins isolée des Loyautés, pourrait ainsi recevoir des flux de gènes de ses deux voisines et de Grande Terre, contribuant à sa forte diversité. Une observation confirme ce point de vue : les chlorotypes présents à Ouvéa et Maré se retrouvent quasiment tous à Lifou (sauf le chlorotype D de Maré).

A l'intérieur de Grande Terre, la diversité des populations n'est pas aussi faible que l'aurait laissée croire leur petite taille (en moyenne par population  $A_{nuc} = 6.2$  pour les **microsatellites nucléaires**,  $C_{cp} = 2.3$  pour les **microsatellites chloroplastiques**). L'explication possible pourrait être celle que nous avons mentionnée en § 2.1., c'est-à-dire que l'île de Grande Terre possédait il y a quelques siècles une forte diversité génétique associée à des populations plus denses, plus continues, et un nombre total d'individus plus important. La fragmentation relativement récente causée par la surexploitation des derniers siècles pourrait alors avoir engendré une diminution du flux de gènes entre elles, et les populations ne seraient donc pas encore revenues à un état d'équilibre. En outre, il n'y aurait pas encore d'effet de consanguinité.

### 2.6.2. Différenciation génétique au sein de l'archipel

Un autre résultat attendu dans un système insulaire concernant la structuration moléculaire est celui d'une forte différenciation entre les îles. Ce point a aussi été vérifié chez *S. austrocaledonicum*, avec un indice de différenciation entre îles de  $F_{stnuc} = 0.35$  pour les **marqueurs nucléaires** et  $F_{stcp} = 0.6$  pour les **marqueurs chloroplastiques** (tableau 2.3). Plus précisément, entre les groupes « Grande Terre et île des Pins » et « Loyautés » précédemment identifiés comme différents au niveau de la diversité génétique, les  $F_{st}$  ont des valeurs très importantes :  $F_{stnuc} = 0.37$  et  $F_{stcp} = 0.65$ . Ces valeurs de  $F_{st}$  sont aussi importantes entre les îles Loyauté  $F_{stnuc} = 0.32$ ,  $F_{stcp} = 0.52$ , et entre populations de Grande Terre :  $F_{stnuc} = 0.20$ ,  $F_{stcp} =$

**Tableau 2.3 :** Résultats d'analyses de variance moléculaire (AMOVA) testant les composants de la variance selon les différentes partitions des populations, pour les microsatellites nucléaires (indice: nuc) et les microsatellites chloroplastiques (indice: cp). Pourcentage de variation: variance associée à la source de variation sur la variance totale, multipliée par 100. Fst: mesure de différenciation entre populations. \*\*\*: p-value hautement significative (P<0.001). Toutes les décompositions en pourcentage de variation sont hautement significatives (P<0.001).

Niveau	Source de variation	degrés de liberté		Pourcentage de variation		Fst	
		cp	nuc	cp	nuc	cp	nuc
<b>Archipel</b>	Entre îles	4	4	37.17	22.11	0.6***	0.35***
	Entre populations à l'intérieur des îles	12	12		12.36		
	A l'intérieur des populations	201	845	28.54	65.53		
	Total	217	861	34.29			
<b>Groupe "Grande Terre et île des Pins" par rapport au groupe "Loyautés"</b>	Entre groupes	1	1	29.55	20.76	0.65***	0.37***
	Entre populations à l'intérieur des groupes	8	8	35.59	16.49		
	A l'intérieur des populations	233	872	34.86	62.75		
	Total	242	881				
<b>Iles Loyauté</b>	Entre îles	2	2	37.87	26.29	0.52***	0.32***
	Entre populations à l'intérieur des îles	6	6	14.64	6.11		
	A l'intérieur des populations	100	395	47.49	67.9		
	Total	108	403				
<b>Grande Terre</b>	Entre populations	5	5	73.04	19.51	0.73***	0.20***
	A l'intérieur des populations	71	330	26.96	80.49		
	Total	76	335				

0.73. De fait, sur cette île, l'éloignement entre les populations et l'isolement de Hienghène par la barrière aux flux de gènes que constitue la chaîne centrale en font un système assez proche d'un système insulaire.

Concernant les  $F_{st}$  par paires de populations, calculés pour les microsatellites nucléaires, et après correction de Bonferroni, les résultats sont les suivants : (i) sur l'ensemble des populations de Grande Terre et de l'île des Pins, seule une paire de populations ne possède pas un  $F_{st}$  significatif : les populations de l'île des Pins Nord et Sud. Les autres paires de populations sont toutes significativement différenciées, avec un  $F_{st}$  moyen de 0.16 et des valeurs allant de  $F_{st} = 0.058^{***}$  entre Tiéa et Pindai à  $F_{st} = 0.30^{***}$  entre Païta et Hienghène, (ii) sur l'ensemble des populations des îles Loyauté, 3 paires de populations possèdent un  $F_{st}$  non significatif : une paire intra-Maré et deux paires intra-Ouvéa. Pour les autres, le  $F_{st}$  moyen est de 0.33 et des valeurs allant de  $F_{st} = 0.05^*$  entre Lifou Nord et Lifou Centre, à  $F_{st} = 0.72^{***}$  entre Maré Sud Ouest et Lifou Sud. Comme on pouvait s'y attendre, la structuration est généralement faible ou inexistante dans les petites îles, et relativement importante entre les îles Loyauté ou entre les populations de Grande Terre, du fait des grandes distances les séparant.

Les résultats des  $F_{st}$  par paires de populations pour les microsatellites chloroplastiques sont moins informatifs car le nombre d'individus analysés est plus faible et la définition de sous-populations dans les Loyautés est inappropriée. Après une correction de Bonferroni, on observe, comme avec les microsatellites nucléaires, des  $F_{st}$  forts, et significatifs pour 88% des paires, qui correspondent à des populations éloignées.

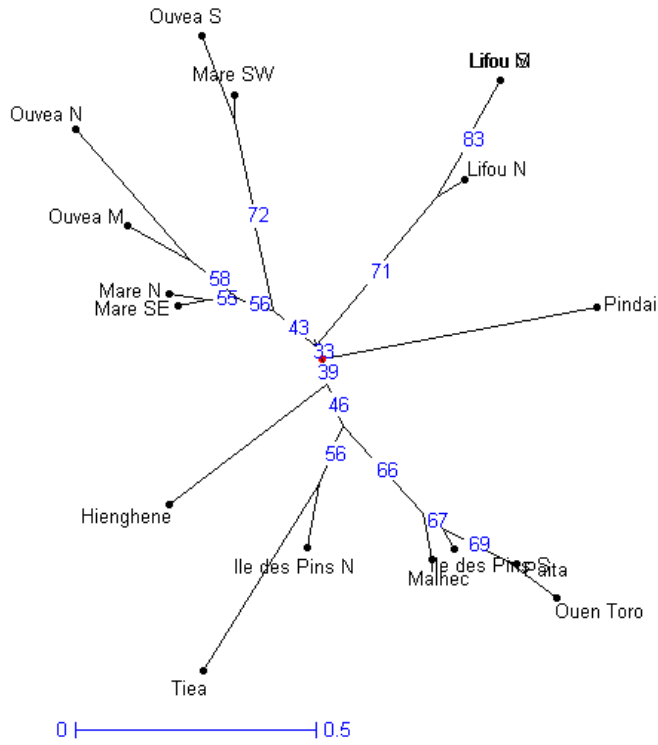
Les tests de Mantel inter-population viennent compléter ces informations sur la structuration génétique entre populations. Ils montrent une corrélation positive entre les distances géographiques et les distances génétiques basées sur les **microsatellites nucléaires** à la fois dans les populations des Loyautés ( $r = 0.65$ ,  $P < 0.001$ ) et sur Grande Terre ( $r = 0.6$ ,  $P < 0.05$ ), ce qui souligne l'existence d'un phénomène d'isolement par la distance dans ces deux groupes. Par contre, il n'y a pas d'isolement par la distance entre l'île des Pins et Grande Terre, ni entre l'île des Pins et les Loyautés. Il semblerait donc que le flux de gène entre Grande Terre Sud et l'île des Pins (cf. § 2.6.1) n'ait plus lieu actuellement.

La combinaison des résultats des **microsatellites nucléaires et chloroplastiques** permet d'établir un arbre consensus (figure 2.3) mettant en évidence la même conclusion principale, c'est-à-dire la structuration en deux groupes avec Grande Terre et l'île des Pins d'une part, et les îles Loyauté d'autre part.

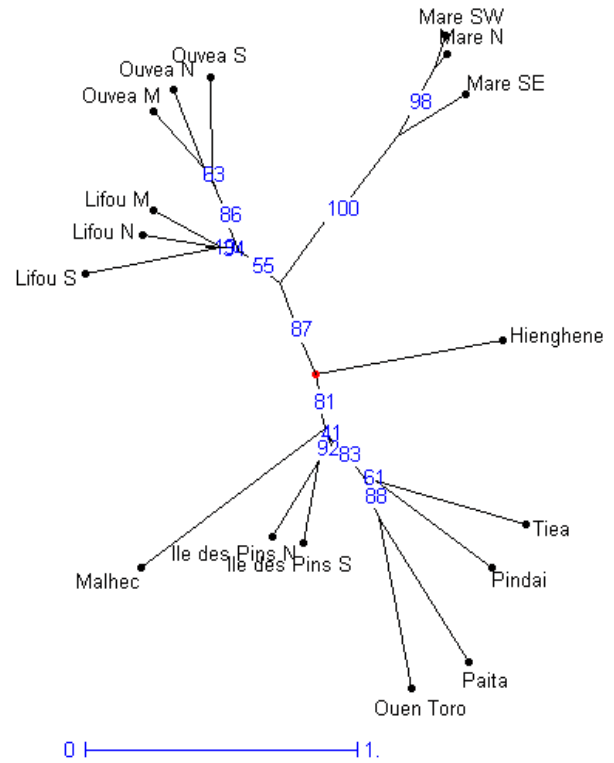
**Figure 2.3:** Arbres de neighbour-joining basés sur les microsatellites nucléaires et chloroplastiques illustrant les relations phylogénétiques entre populations. Les valeurs de bootstrap calculées après 1000 permutations sont présentées à la base de chaque nœud.

- a) microsatellites nucléaires
- b) microsatellites chloroplastiques
- c) arbre consensus

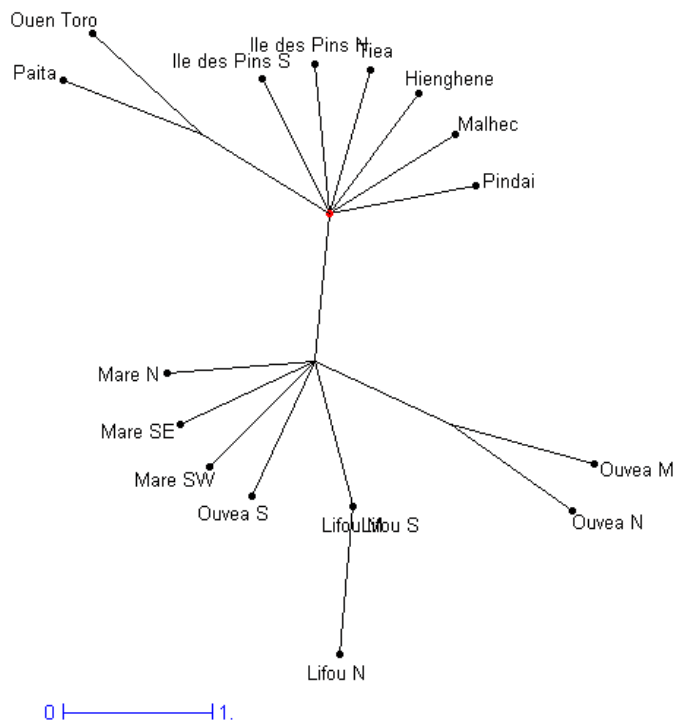
a/



b/



c/



### 2.6.3. Comparaison des espèces insulaires et continentales

Il est généralement admis que les espèces insulaires présentent une diversité génétique plus faible que leurs homologues continentales (Blondel, 1995 ; Barrett, 1998 ; Frankham, 2002). L'effet de fondation à l'origine de la colonisation d'une île entraîne en effet souvent une perte importante de la diversité présente sur le "continent-mère". Dans notre étude, la gamme de variation de la diversité est très forte (tableau 2.4.) ( $H_{enuc}= 0.11-0.74$ ,  $H_{cp}= 0.00-0.69$ ), rendant les comparaisons avec d'autres espèces forestières difficiles. Cependant la diversité est nettement plus forte dans l'île de Grande Terre, la plus vaste de l'archipel calédonien (tableau 2.3 :  $H_{enuc}= 0.79$ ,  $H_{cp}= 0.70$ ) et proche de celle d'espèces continentales (tableau 2.4, ex : *Swietenia macrophylla*,  $H_{enuc}= 0.78-0.81$  ; Lemes *et al.*, 2003), que dans les petites îles de Maré et Ouvéa ( $H_{enuc}= 0.14-0.37$ ,  $H_{cp}= 0.21-0.45$ ) dont les paramètres sont plus voisins de ceux d'espèces insulaires (tableau 2.2, ex : *Santalum insulare*,  $H_{enuc}= 0.27-0.56$  ; Bouvet, non publié). L'île des Pins et Lifou constituent des cas particuliers comme nous l'avons évoqué précédemment.

La différenciation entre populations sur la base des microsatellites nucléaires ( $F_{stnuc}= 0.33$ ) est nettement plus forte que celle de toutes les autres espèces présentées en tableau 2.4., notamment les espèces continentales. Ce résultat n'est pas surprenant, car contrairement aux continents où les flux de gènes peuvent être continus, les barrières géographiques entre les îles conduisent celles-ci à évoluer de façon différente, créant ainsi une structuration entre îles. En revanche, contrairement à l'attendu, le  $F_{st}$  basé sur les microsatellites chloroplastiques n'est pas très différent de celui d'autres espèces forestières insulaires comme continentales, et a une valeur importante ( $F_{stcp}= 0.6$ ). Ceci témoigne d'un flux de graines autant limité en milieu continental qu'en milieu insulaire, dû au mode de dissémination des espèces forestières, souvent barochore ou zoochore, mais avec des disséminateurs ne parcourant généralement pas de très grandes distances.

### 2.6.4. Comparaison des flux par graine et par pollen

Notre étude concernant à la fois les **microsatellites nucléaires et chloroplastiques** a permis la comparaison entre les flux de pollen et de graines, via la formule d'Ennos (1994). Nous avons considéré séparément les cas de Grande Terre et des Loyautés. En effet, leurs tailles étant très différentes - Grande Terre a un fonctionnement presque comparable à celui d'un continent-, les flux intra-îles ne sont pas comparables pour ces deux entités. Les résultats montrent que le flux de pollen est 8 fois plus fort que le flux de graines sur Grande Terre ( $R_{p/g} = 8$ ), alors que sur les Loyautés ces flux sont égaux ( $R_{p/g}= 1$ ). L'explication la plus probable à

**Tableau 2.4.**

Principaux paramètres de diversité et de différenciation entre populations estimés avec des microsatellites nucléaires et chloroplastiques chez différentes espèces d'arbres, à distribution insulaire ou continentale.  $N$ : nombre d'individus,  $H_{enuc}$ : hétérozygotie attendue,  $F_{st}$  indice de structuration,  $F_{is}$ : déficit en hétérozygotes,  $C_{cp}$ : nombre de chlorotypes (=hapotypes) par population,  $H_{cp}$ : diversité chloroplastique.

Espèce	Caractéristiques de l'espèce		Etudes microsatellites nucléaires					Etudes microsatellites chloroplastiques			
	distribution	mode de dispersion	$N$	$H_{enuc}$	$F_{stnuc}$	$F_{is}$	Référence	$N$	$H_{cp}$	$F_{step}$	Référence
<i>Santalum austrocaledonicum</i>	insulaire	barochore/zoochore	431	0.11-0.74	0.33	0.03-0.67	Bottin <i>et al.</i> (2005)	218	0.00-0.69	0.6	Bottin <i>et al.</i> (np)
<i>Pterocarpus officinalis jacq.</i>	insulaire	barochore/hydrochore	202	0.24-0.59	0.29	0.04-0.37	Müller (non publié)	116	0.22-0.68	0.58	Müller (non publié)
<i>Santalum insulare</i>	insulaire	zoochore	162	0.27-0.56	0.23	0.12	Bouvet (non publié)	343	0.40 -0.67	0.67	Butaud <i>et al.</i> (2005)
<i>Caryocar brasiliense</i>	continentale	barochore/zoochore	314	0.58-0.85	0.11	0.15-0.07	Collevatti <i>et al.</i> (2001)	160	-	0.84	Collevatti <i>et al.</i> (2003)
<i>Dalbergia monticola</i>	continentale	barochore/zoochore	-	-	-	-	-	100	0.00-0.80	0.57	Andrianoelina <i>et al.</i> (2005)
<i>Vitellaria paradoxa</i>	continentale	barochore/zoochore	169	0.25-0.42	0.05	ns	Sanou <i>et al.</i> (2005)	116	0.00-0.49	0.88	Fontaine <i>et al.</i> (2004)
<i>Corylus avellana</i>	continentale	barochore/zoochore	-	-	-	-	-	248	0.43	0.85	Palme & Vendramin (2002)
<i>Grevillea macleayana</i>	continentale	barochore	130	0.42-0.53	0.22	0.07-0.31	England <i>et al.</i> (2002)				
<i>Vouacapoua americana</i>	continentale	zoochore	408	0.34-0.52	0.08	0.09-0.22	Dutech <i>et al.</i> (2004)				
<i>Symphonia globulifera</i>	continentale	barochore/zoochore	914	0.72-0.85	-	0.20	Aldrich <i>et al.</i> (1998)				
<i>Swietenia macrophylla</i>	continentale	barochore/zoochore	194	0.78-0.81	0.1	0.06-0.10	Lemes <i>et al.</i> (2003)				
<i>Swietenia macrophylla</i>	continentale	barochore/zoochore	284	0.59-0.80	0.11	0.07-0.24	Novick <i>et al.</i> (2003)				
<i>Melaleuca alternifolia</i>	continentale	barochore/zoochore	500	0.13-0.92	0.07	0.07-0.29	Rossetto <i>et al.</i> (1999)				

cette différence est celle d'une distance de pollinisation moins importante sur les petites îles que sur Grande Terre, qui serait due à un déficit de pollinisateurs. En effet, comme rapporté dans l'introduction de cette thèse, la diminution de la densité des pollinisateurs sur les îles par rapport aux continents est un phénomène fréquemment observé (Barrett, 1996). En comparaison avec d'autres espèces le ratio  $R_{p/g}$  de *S. austrocaledonicum* est extrêmement faible : pour *Quercus robur* et *Quercus petraea*, espèces continentales à dissémination anémophile,  $R_{p/g}$  est respectivement de 286 et 500 (King et Ferris, 1998), de même pour *Vitellaria paradoxa*, espèce continentale entomophile  $R_{p/g} = 47$ . La comparaison de ces 3 dernières espèces, à modes de pollinisation différents (mais ayant toutes par ailleurs une dissémination des graines zoochore), permet en outre de vérifier l'importance du mode de pollinisation dans la valeur du ratio  $R_{p/g}$ , le pollen transporté par le vent pouvant parcourir des distances beaucoup plus importantes que lorsqu'il est transporté par des insectes.

Cette étude met donc en évidence une dissémination du pollen relativement plus importante sur l'île de Grande Terre que sur les petites îles Loyauté. Une autre hypothèse non exclusive de la précédente est celle d'une dissémination des graines relativement plus efficace sur les Loyautés que sur Grande Terre, pouvant être due, par exemple, à une densité d'oiseaux disséminateurs supérieure ou à des cortèges d'oiseaux différents, sur les Loyautés. Ces deux hypothèses devront être vérifiées à l'avenir, à l'aide de relevés entomologiques et ornithologiques.

## **2.7. Une structuration génétique faible intra-population (sur Grande Terre), et intra-île (pour les autres îles)**

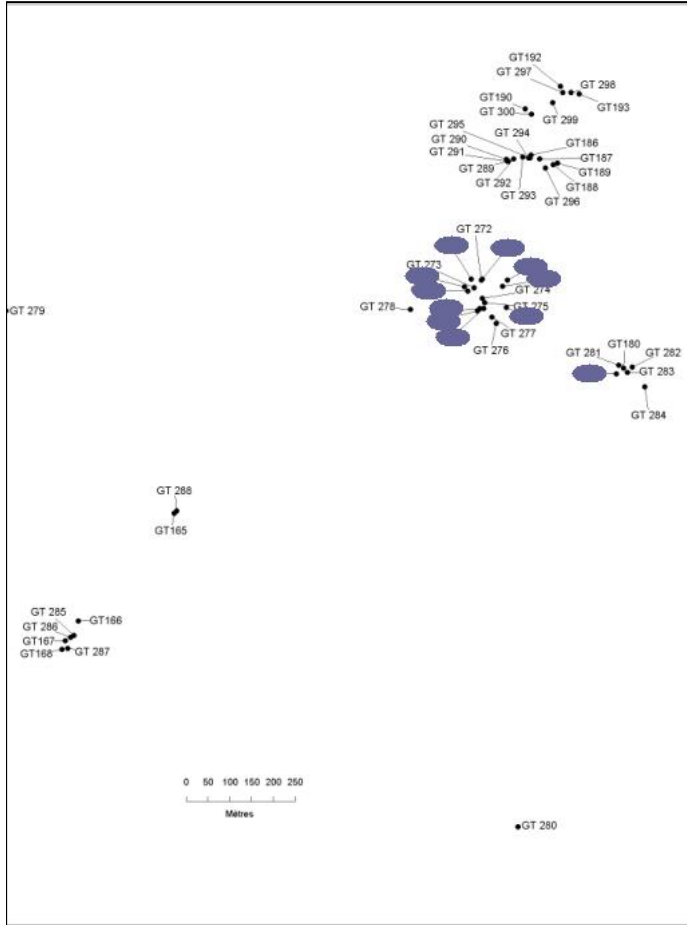
- **Microsatellites chloroplastiques**

Les résultats montrent que les populations sur Grande-Terre sont différentes entre elles mais présentent peu de variation au sein de chacune d'elles. Sur Ouvéa les chlorotypes sont nettement différents entre la partie Nord (chlorotype B) et la partie Sud (chlorotype F). Sur Lifou on constate en revanche l'existence de nombreux chlorotypes, et une micro-structuration de ceux-ci, notamment le chlorotype B au Nord et à l'Ouest. L'hypothèse du drageonnage n'est pas valable, car les individus issus de drageonnage sur un rayon de 100 m ont été ôtés de l'étude, or ici, les arbres de même chlorotype sont proches de quelques mètres seulement (figure 2.4). Cette micro-structuration ne peut donc être attribuable qu'à une dispersion des graines à courte distance (le génome chloroplastique ayant une transmission

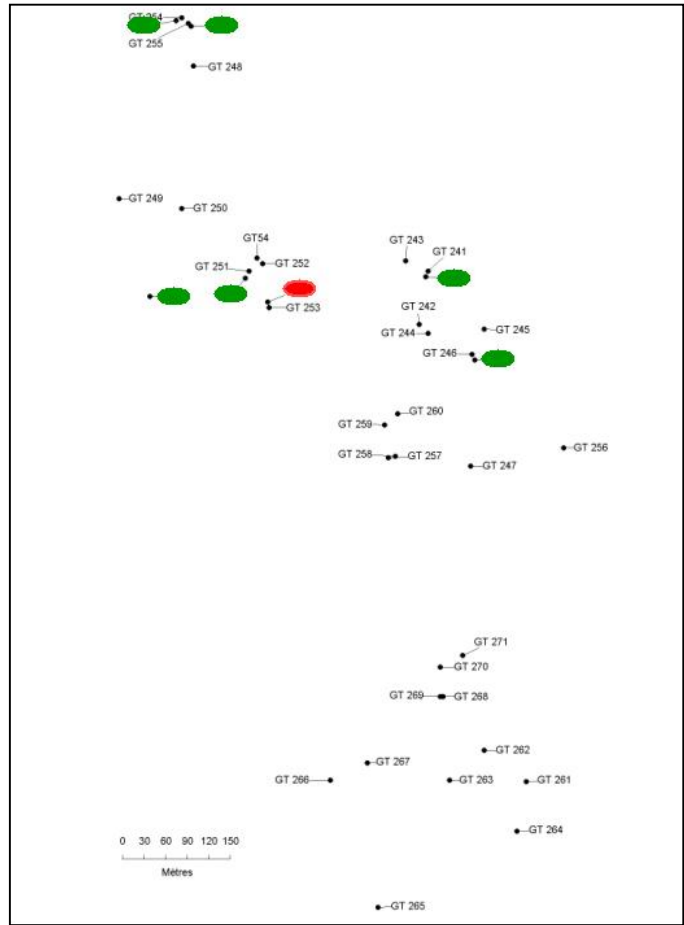


**Figures 2.4:** localisation des chlorotypes à l'intérieur des populations. Ne sont représentés que les individus analysés par microsatellites chloroplastiques ayant amplifié aux trois loci, et possédant des coordonnées géographiques.

a/ Hienghène

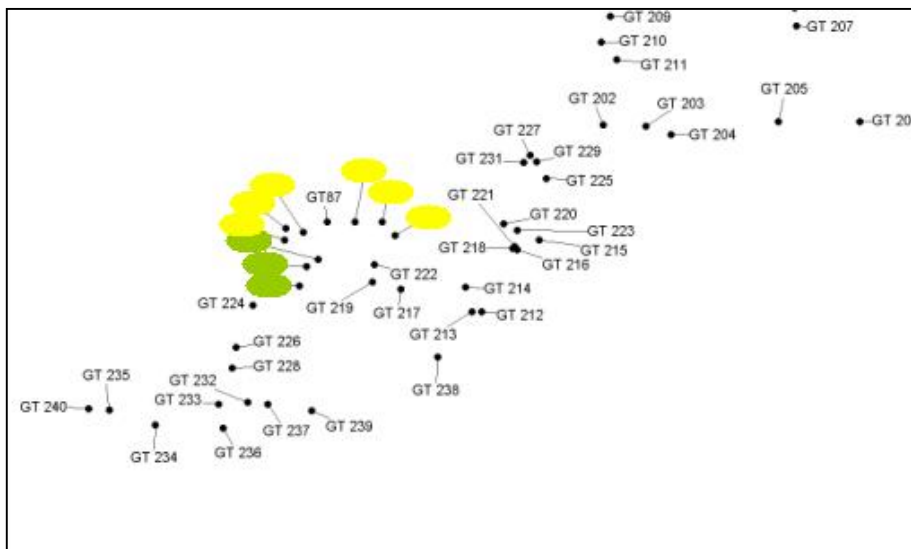


b/ Malhec



c/ Païta

- A
- B
- C
- D
- E
- F
- G
- I
- J
- K
- M
- O



maternelle le flux de pollen n'intervient pas). Celle ci pourrait être la résultante de disséminateurs restant dans un faible périmètre.

Nous avons voulu vérifier si sur cette île en particulier il existait un isolement par la distance au niveau des chlorotypes. Mais le test de Mantel, effectué au niveau intra-île sur Lifou avec les chlorotypes, ne montre aucun phénomène d'isolement par la distance (coefficient de corrélation :  $R= 0.015$ ,  $p= 0.289$ ).

- **Microsatellites nucléaires**

Les tests de Mantel (figure 2.5) révèlent comme attendu (voir § 2.1) l'absence d'isolement par la distance dans les petites populations de Païta et Malhec ainsi qu'à l'île des Pins, un isolement faible et peu significatif à Lifou, confortant le résultat obtenu précédemment avec les microsatellites chloroplastiques ; en revanche à Ouvéa, Maré, Pindaï et Hienghène, le coefficient de corrélation entre distance géographique et distance génétique est très significatif, mais le possède une valeur faible.

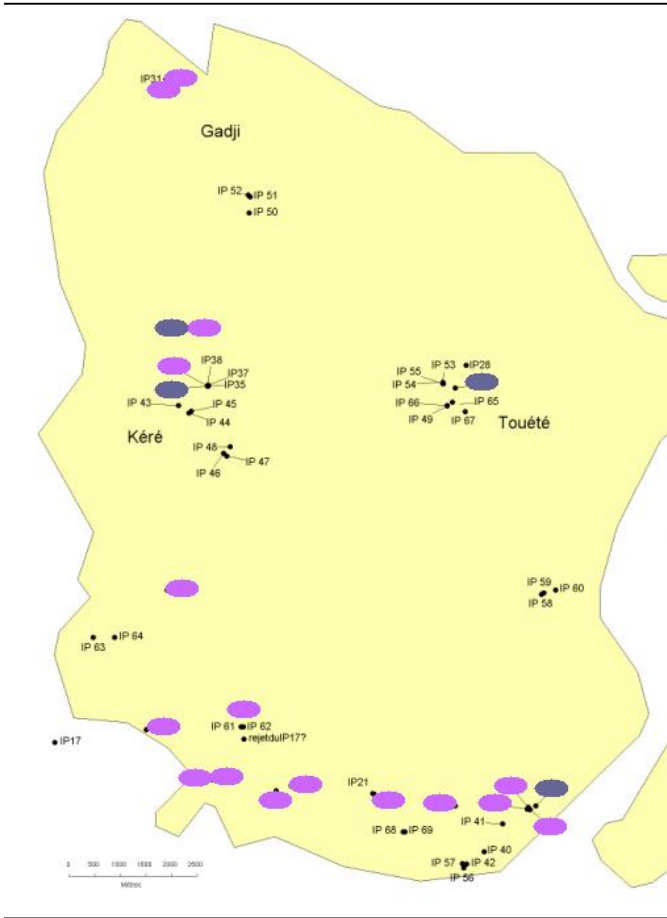
La faiblesse de l'isolement par la distance s'explique principalement par la petite taille des îles ou populations et leur géographie permettant aux pollinisateurs et disséminateurs de les parcourir sans problème, contribuant ainsi à un bon brassage génétique.

## **2.8. Un déficit en hétérozygotes sur certaines îles**

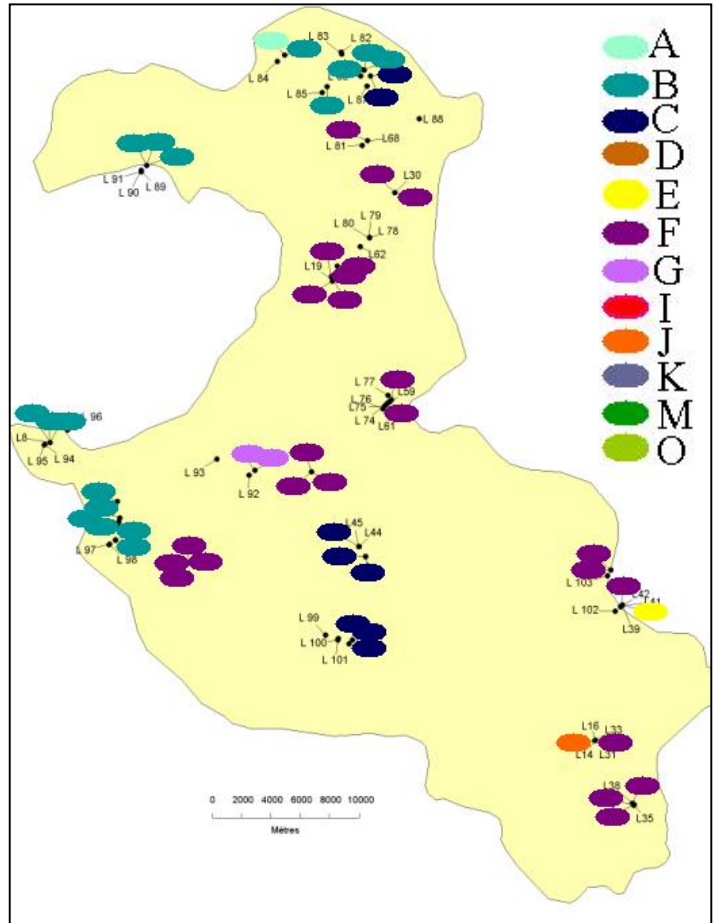
Notre étude avec les microsatellites nucléaires met en évidence un fort déficit en hétérozygotes dans presque toutes les îles, en particulier sur les îles Loyauté ( $F_{is}$  pour Grande Terre : 0.17 \*\*\*, pour l'île des Pins : 0.0 ns, pour Lifou : 0.25\*\*\*, Maré : 0.62\*\*\*, Ouvéa : 0.14\*). La gamme de variation du  $F_{is}$  au sein de cette espèce est beaucoup plus grande que celle d'autres espèces, y compris insulaires, comme le montre le tableau 2.4. Ce déficit en hétérozygotes peut avoir plusieurs explications :

La première est la présence d'allèles nuls. Les allèles nuls sont des allèles qui n'amplifient pas pour cause de mutation dans la région flanquante du locus microsatellite, où l'amorce devrait s'hybrider (Callen *et al.*, 1993). Pour un individu donné, si un des chromosomes possède un allèle nul et l'autre peut être amplifié normalement par l'amorce, on lira une seule bande sur le gel de révélation. Cet individu sera donc interprété comme étant homozygote pour le locus étudié, alors qu'il est hétérozygote. Dans le cas de notre analyse, l'existence d'allèles nuls ne semble pas l'explication la plus probable. En effet il peut s'agir d'hétérozygotes avec

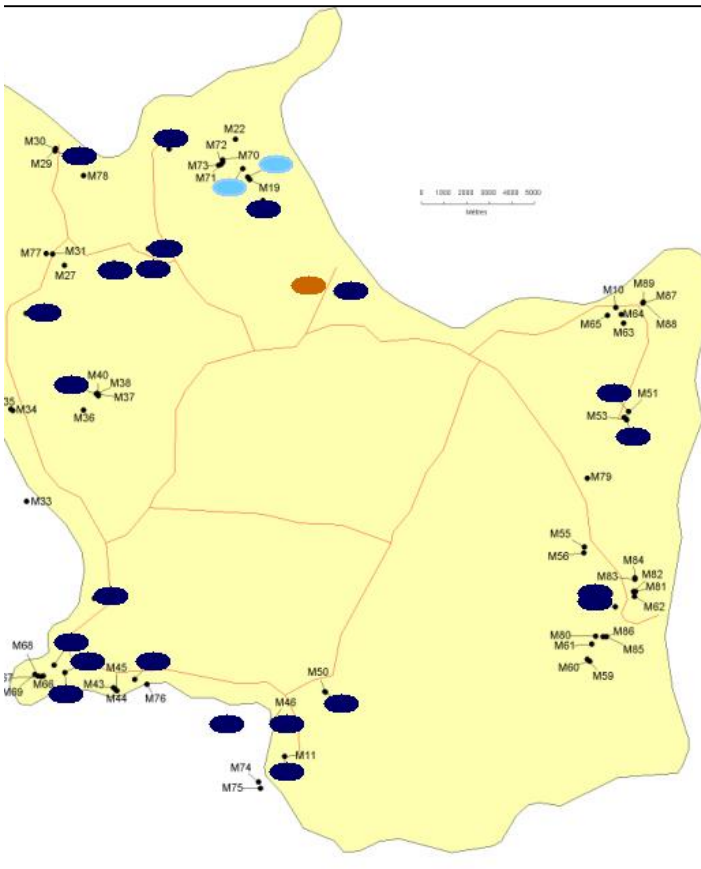
d/ île des Pins



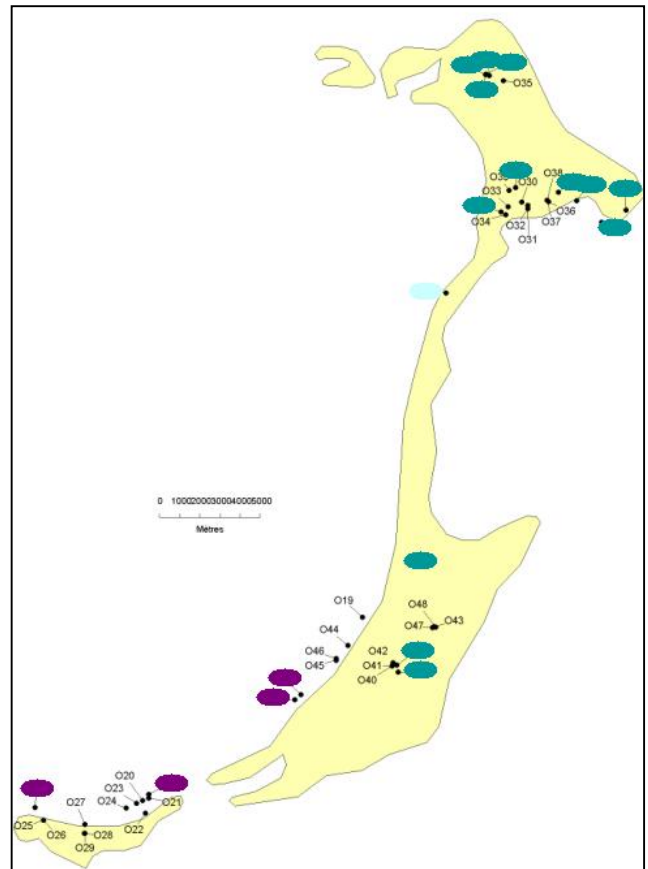
e/ Lifou



f/ Maré



g/ Ouvéa



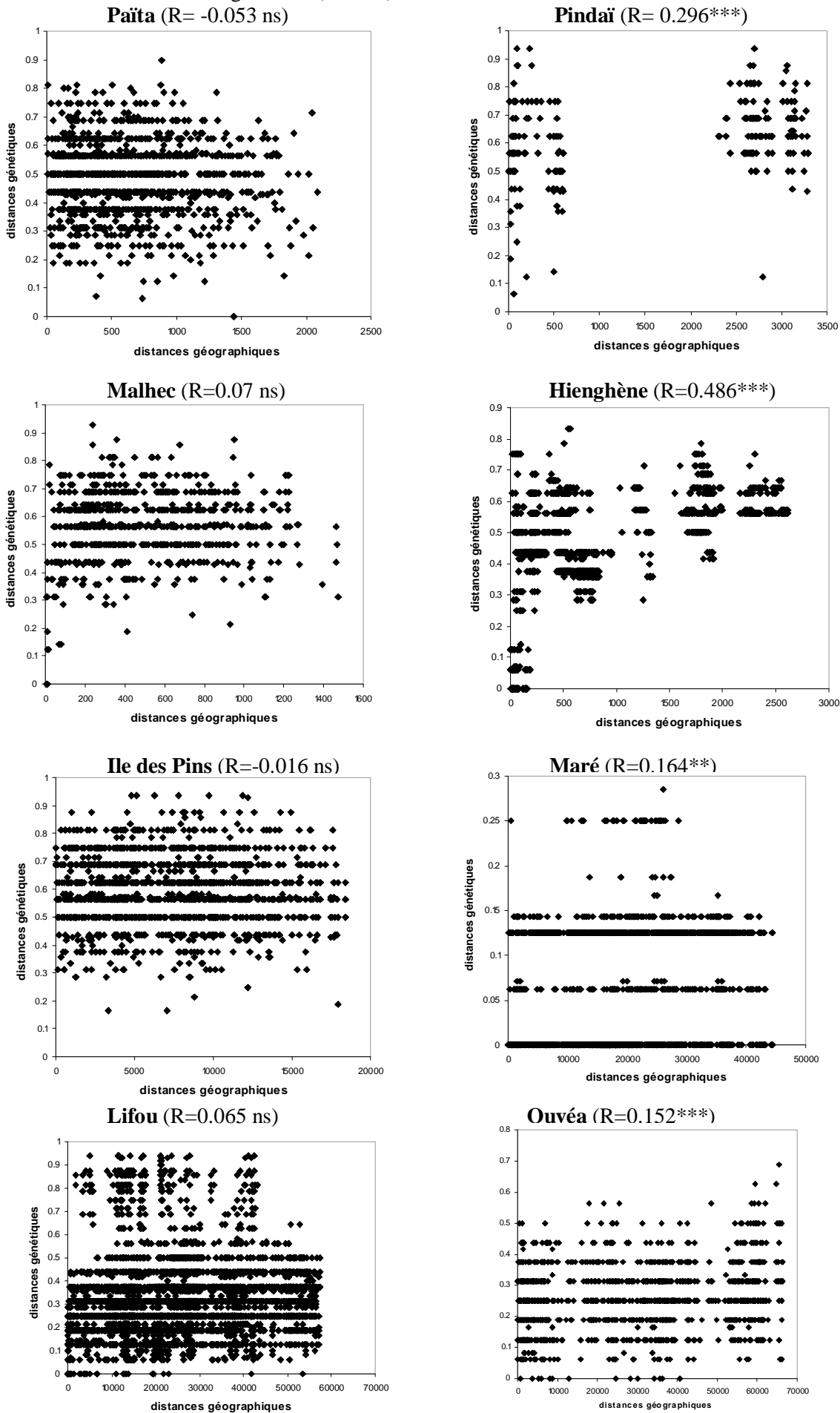
effectivement des allèles nuls, mais dans ce cas nous aurions pu attendre (i) une plus forte proportion de données manquantes (2 individus hétérozygotes avec un allèle nul ont une chance sur 4 de donner un individu homozygote) (ii) que la présence d'un seul allèle amplifié n'ait lieu que pour quelques loci, or ici tous les loci sont homozygotes ce qui suppose donc un allèle nul par locus, et cette coïncidence semble peu probable (iii) la présence d'un locus avec des  $F_{is}$  positifs pour toutes les populations, témoignant d'une particularité à l'amplification, ce qui n'est pas le cas dans notre étude (données non figurées). Nous avons néanmoins utilisé le logiciel MICRO-CHECKER 2.2.3. (Van Oosterhout *et al.*, 2004) afin d'identifier la présence éventuelle d'allèles nuls mais aucun n'a été décelé parmi les 8 loci étudiés.

S'il n'existe pas de preuve évidente de la présence d'allèles nuls, nous ne rejettons toutefois pas l'hypothèse de leur existence. Cependant, elle ne semble certainement pas être la cause principale du fort déficit en hétérozygotes à Maré. Une façon de tester la présence des allèles nuls dans l'avenir serait de synthétiser de nouvelles amorces s'hybridant en amont ou en aval de la zone qui servait précédemment d'ancrage à l'amorce, afin de voir si les individus caractérisés comme homozygotes étaient toujours interprétés comme tels avec les nouvelles amorces, comme suggéré par Gibbs *et al.* (1997). Nous avons décidé de ne pas éliminer les loci présentant potentiellement des allèles nuls pour les analyses, car ces dernières donnaient des résultats similaires avec ou sans ces loci qui semblaient particuliers.

Une seconde explication peut être l'effet Wahlund. Son principe est le suivant : lorsque des sous-populations panmictiques dont les fréquences alléliques sont différentes sont mélangées, on observe sur l'ensemble un déficit d'hétérozygotes par rapport aux attendus d'Hardy Weinberg, bien que les sous-unités aient toutes la structure de Hardy Weinberg.

Ce phénomène peut expliquer le déficit en hétérozygotes de l'ensemble des îles, car les populations analysées présentent des  $F_{st}$  significatifs entre elles (cf § 2.6). Cette hypothèse est confirmée en particulier sur Grande Terre ( $F_{is} = 0.17^{***}$ ) par l'observation que, prises individuellement, les populations de Grande Terre ont des  $F_{is}$  très faibles ou non significatifs (cf tableau 2.2). La même explication est valable pour Ouvéa, dont le  $F_{is}$  global est de 0.14 ( $p$ -value < 0.05), mais dont les 3 sous-populations sont significativement différentes sur le plan génétique ( $F_{st} > 0$ ), et 2 sous-populations présentent un déficit en hétérozygotes non significatif. Dans les autres îles, la différenciation entre sous-populations est aussi à l'origine de l'effet Wahlund, mais ces sous-populations ne sont elles-mêmes pas en panmixie. Leur déficit en hétérozygotes peut être dû à un effet Wahlund à l'intérieur de ces sous-populations, s'il existe une micro-structuration. Cette hypothèse a été évoquée pour Lifou avec

**Figure 2.5:** Tests de Mantel par population entre les distances génétiques calculées par « simple matching » sur les données alléliques, et les distances euclidiennes géographiques (en mètres). R= coefficient de corrélation, ns : non significatif ( $P>0.05$ ), \*: $P<0.05$ , \*\*: $P<0.01$ , \*\*\*: $P<0.001$ .



l'observation des chlorotypes (§2.7) et serait intéressante à tester, avec un échantillonnage plus exhaustif d'individus sur les îles.

Certaines caractéristiques du Santal en font une espèce encline à l'effet Wahlund, notamment son mode de dissémination à faible distance (insectes pour le pollen, oiseaux pour les fruits). De plus, si les disséminateurs viennent à manquer, les fruits sont simplement dispersés par gravité dans un voisinage proche de l'arbre mère, créant ainsi une sous-structuration au voisinage d'un arbre-mère.

L'effet Wahlund peut aussi être temporel (Morand *et al.*, 2002), lorsque les dates de floraison ne sont pas les mêmes entre les arbres. Ce phénomène engendre une reproduction uniquement entre les arbres fleurissant en même temps, la population n'est donc pas en panmixie. Ce phénomène de floraison décalée est très probable chez *Santalum austrocaledonicum*, pour laquelle il n'existe pas de véritable saison de floraison, les arbres pouvant fleurir à n'importe quel moment de l'année. Cependant, comme nous l'avons décrit dans l'article (Bottin *et al.*, 2005a), ceci pourrait expliquer un effet Wahlund si l'on suppose qu'il existe à la base des regroupements d'individus ayant les mêmes périodes de floraison, et que ces individus conservent ces périodes de floraison d'une année sur l'autre. De plus, il faudrait que ces regroupements d'individus aient développé un profil particulier sur les microsatellites neutres, ou alors que ces marqueurs soient en déséquilibre de liaison avec les marqueurs codant pour cette homogamie.

Une troisième explication à ce déficit en hétérozygotes est l'existence d'autofécondation directe (sur une même fleur) ou indirecte (entre fleurs d'un même arbre, aussi appelée geitonogamie), ou de croisements entre apparentés. Si les insectes pollinisateurs manquent la période de floraison, il est probable que le mode de reproduction adopté soit l'autofécondation. De même, si les arbres ont une densité très faible, les pollinisateurs tendent à rester sur le même arbre, ce qui peut engendrer aussi un fort taux d'autofécondation.

Hallé (1988) rapporte que *Santalum austrocaledonicum* est très certainement une espèce allogame. Cependant notre étude suggère que l'autofécondation est possible et même très probable. Nous n'avons encore aucune preuve concrète que cette espèce est sujette à l'autofécondation, et si tel est le cas, ne savons pas encore dans quelle proportion elle la pratique par rapport à l'allofécondation. Une étude a été mise en place à cet effet, sur le site de Ouen Toro, proche de Nouméa. Cette étude consiste en un inventaire et un génotypage des individus sur le site du Ouen Toro, ainsi qu'un génotypage des individus juvéniles issus de graines récoltées sur quelques-uns de ces individus génotypés et élevés dans un essai contrôlé.



Elle vise à répondre à plusieurs questions, notamment : (i) comment s'organisent les flux géniques à l'échelle d'une parcelle, quelle est en particulier l'influence de la distance entre arbres pour la probabilité qu'un arbre en féconde un autre? (ii) combien de pères sont à l'origine des descendants d'un même arbre ? Il s'agit d'une manipulation de grande ampleur, qui devrait livrer ses premiers résultats au courant de l'année 2006.

Dans le cas du Santal, on peut aussi penser à une reproduction assimilable à de la geitonogamie, entre arbres issus du drageonnage, très fréquent chez cette espèce. Ce dernier crée en effet une sous-structuration de clones dans un même voisinage, dont la reproduction revient à un phénomène d'autofécondation.

L'autofécondation directe, ou indirecte (via une fleur différente du même arbre ou un arbre clone issu du drageonnage), peut conduire à un effet Wahlund si les graines sont dispersées à faible distance de l'arbre mère, par manque de disséminateur par exemple.

La dernière possibilité d'explication du fort déficit en hétérozygotes est celle d'avoir échantillonné des clones, malgré notre processus de sélection d'individus, du fait d'un seuil de détection trop faible de ceux-ci. Nous avons en effet fixé à 100 m le rayon sur lequel les clones devaient être identifiés et ôtés de l'étude, et il est possible, bien que peu probable, que des clones existent à plus grande distance. Généralement, les arbres pratiquant le drageonnage ont des racines adventives pouvant s'éloigner jusqu'à plus de 20 m de la base du tronc. Mais si l'on suppose que le Santal a effectué ce mode de reproduction durant de nombreuses générations, des clones peuvent être éloignés de plusieurs dizaines voire centaines de mètres. Ainsi, bien que nous ayons éliminé les arbres trop proches les uns des autres, il est possible que nous ayons échantillonné des clones dus au drageonnage.

Le déficit en hétérozygotes au sein des îles peut donc avoir plusieurs explications dont les plus probables sont celles d'un effet Wahlund, d'un régime d'autofécondation ou croisement entre apparentés, même si l'on ne peut écarter l'existence d'allèles nuls dans certaines populations.

## **2.9. Un scénario de colonisation dans l'archipel**

Du fait de l'absence de recombinaison et d'un faible taux de mutation, le génome chloroplastique est idéal pour l'étude des phénomènes de colonisation (§2.2).





Dans notre étude, les 15 chlorotypes identifiés s'organisent autour de 3 chlorotypes centraux (C, K et H) (figure 2.2b) qui sont aussi les plus fréquents dans l'ensemble de la population, et sont séparés les uns des autres par une mutation. Parmi les 15 chlorotypes observés, seuls 2 (C et H) sont communs à Grande Terre, l'île des Pins et aux îles Loyauté et sont parmi les 3 centraux, 7 sont propres aux Loyautés et 6 sont présents seulement sur Grande Terre et l'île des Pins. Le chlorotype le plus central (K) appartient à Grande Terre et l'île des Pins, et sa position suggère qu'il est à l'origine des 2 autres (C et H). Cette observation tendrait à montrer que les populations de Grande Terre et de l'île des Pins sont à l'origine de celles des îles Loyauté, c'est-à-dire que le Santal aurait d'abord colonisé Grande Terre puis dans un second temps les îles Loyauté.

Les résultats de l'analyse des microsatellites nucléaires viennent aussi enrichir ce scénario de colonisation avec une diversité globalement plus faible sur les îles Loyauté que sur Grande Terre et l'île des Pins.

Cette histoire de colonisation concorde avec l'histoire géologique de l'archipel. Grande Terre et l'île des Pins sont en effet les plus anciennes îles de l'archipel et ont été raccordées à de nombreuses reprises, et les Loyautés sont apparues plus tardivement (chapitre 1).

## **2.10. Aspect démographique : une expansion récente**

La recherche, par le logiciel « Bottleneck », de populations ayant subi un goulot démographique récent, s'est avérée infructueuse. En effet pour toutes les populations, le test de Wilcoxon, permettant de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'hétérozygotie observée est supérieure à celle attendue sous l'hypothèse d'équilibre d'Hardy-Weinberg ( $H_o > H_{eq}$ ), s'est révélé non significatif. Nous devons donc admettre que les événements de colonisation ont eu lieu il y a déjà bien longtemps, les populations ayant eu le temps de recouvrer un certain équilibre depuis.

Par contre, les tests mettent en évidence une tendance inverse significative ( $p < 0.05$ ), c'est-à-dire  $H_e < H_{eq}$ , pour trois populations : l'île des Pins, Lifou et Ouvéa. Ce résultat signale un phénomène d'expansion démographique net au sein de ces îles. Or nous avons vu dans le chapitre 1 que depuis la mise en place de quotas de récoltes en 1988, les populations avaient recouvré une bonne santé démographique à Lifou et Ouvéa. Il est donc très possible que des arbres issus de cette régénération récente aient été récoltés lors des campagnes d'échantillonnage qui ont permis nos analyses de microsatellites, et aient donc signalé une expansion démographique au sein de ces îles. Pour l'île des Pins, la démographie récente n'est



pas connue, mais nous avons émis l'hypothèse qu'un phénomène similaire était la cause de l'expansion observée. Un autre phénomène pourrait expliquer cette expansion : la multiplication des pratiques culturelles qui ouvrent les terrains et les rendent favorables à la colonisation par le Santal. Il est possible que Maré soit soumise à ce phénomène d'expansion démographique intra-île bien que, d'une part, du fait de son trop grand nombre de loci monomorphes, elle n'ait pu être testée convenablement par le logiciel Bottleneck, et d'autre part l'étude de Brinkert (2003) nous ait permis au chapitre 1 de montrer que Maré souffrait d'une régénération moins importante qu'Ouvéa et Lifou.

**Conclusion du chapitre 2 :** Cette première étude permet de dresser un bilan de la structuration génétique de *Santalum autrocaledonicum* sur son aire de répartition et présente des pistes pour comprendre la colonisation de l'archipel, et le fonctionnement des populations. La richesse géographique de l'archipel crée de multiples sources d'isolement pour les populations : les barrières océaniques, la chaîne centrale de Grande Terre, mais aussi l'exploitation qui, sur Grande Terre, a créé une fragmentation et un isolement par la distance des populations. La dérive agit sur ces petites populations, créant de fortes dissimilitudes génétiques entre les populations ou îles éloignées. Certaines situations restent inexplicables, comme la très faible diversité à Maré qui devrait faire l'objet de recherches ultérieures.



## ***CHAPITRE 3***

***Etude de la variation de caractères à valeur adaptative***



Les graines et les feuilles sont des caractères potentiellement soumis à la sélection et fréquemment utilisés en écologie végétale car ils sont facilement mesurables et fortement corrélés à de nombreux traits d'histoire de vie des plantes (Meziane et Shipley, 1999 ; Westoby, 2002). La taille des feuilles influence notamment le taux de croissance des plantes (Poorter et Remkes, 1990 ; Garnier, 1992) les échanges de gaz (Reich *et al.*, 1997), ou encore les paramètres biochimiques liés à la photosynthèse (Niinemets et Tenhunen, 1997). La taille des graines quant à elle agit sur leur mode de dispersion et sur leur survie, notamment pendant les premières phases d'établissement de la jeune plantule (Moles et Westoby, 2004).

Ce chapitre vise à connaître les déterminants de la variabilité de la taille des graines et des feuilles de Santal en Nouvelle-Calédonie. L'étude des feuilles a été menée sur des individus juvéniles car leurs feuilles ont une forme différente des individus adultes et semblaient avoir des formes distinctes selon les provenances selon Hallé (1988). Cette première étude se veut exploratoire car l'échantillonnage est insuffisamment rigoureux. En effet, du fait des difficultés de récolte (la période de fructification n'étant pas définie dans le temps, et les arbres difficiles à trouver), les graines ont été récoltées à des années différentes, et les effectifs récoltés par population étaient très déséquilibrés. Nous présentons donc ici simplement le bilan des observations et mesures faites sur la variabilité des graines et des feuilles au sein de l'espèce, et une réflexion sur les causes possibles de cette variabilité.

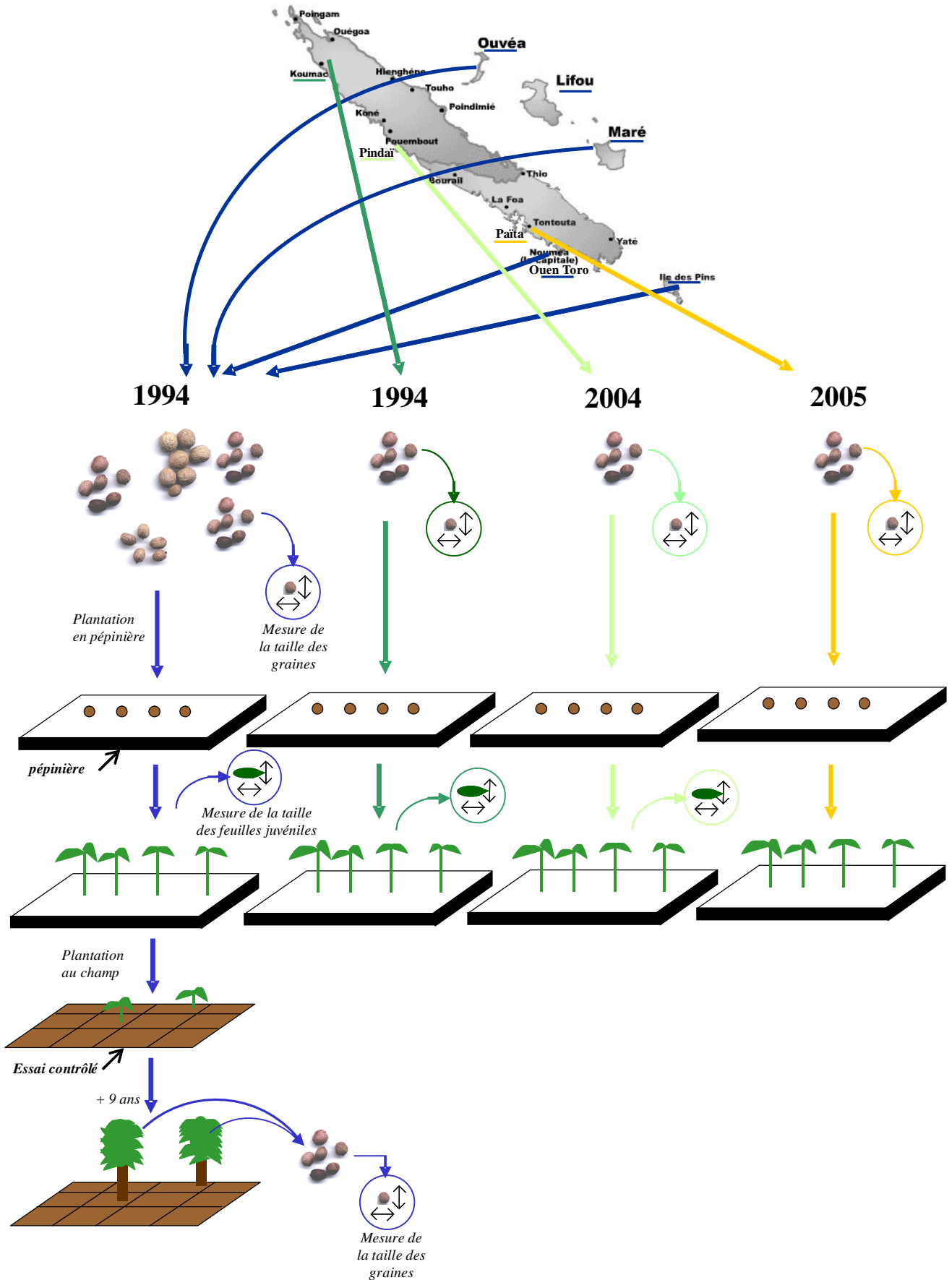
### 3.1. Echantillonnage des graines et des feuilles juvéniles

Plusieurs types d'échantillons ont été utilisés pour cette étude (cf figure 3.1, et tableau récapitulatif 3.a. ci-dessous) :

- Un essai contrôlé a été mis en place par le CIRAD-forêt à Kaddour, petite localité proche de Païta (latitude : 22°09', longitude : 166°22') en **1994**. Cet essai avait pour but d'étudier d'un point de vue morphologique (caractères des fleurs, graines et plantules) les 3 variétés reconnues de Santal néo-calédonien : *austrocaledonicum* dans les Loyautés et l'île des Pins, *pilosulum* sur Grande Terre et *minutum* à Koumac. Cette étude était partie de l'observation que les plants juvéniles de la variété *austrocaledonicum* n'étaient pas les mêmes morphologiquement dans les Loyautés et à l'île des Pins. Des fruits ont été récoltés dans les populations naturelles de **Maré, Ouvéa, l'île des Pins et Ouen Toro**. Sur cette récolte, 255 graines au total parmi les variétés *austrocaledonicum* et *pilosulum* ont été mesurées en longueur et largeur (Nasi



**Figure 3.1:** les différents échantillonnages pour la mesure de la taille des graines et des feuilles juvéniles



1994). Seules les moyennes par population ont été conservées. Puis l'ensemble des graines récoltées a été planté en pépinière. La longueur et la largeur ont été mesurées sur des feuilles de 101 individus juvéniles (28 en provenance de Maré, 28 de Ouen Toro et 45 de l'île des Pins), élevés dans ces mêmes conditions de pépinière. Les plantules ont ensuite été replantées dans un dispositif mono-arbre séparant distinctement les principales provenances testées et reproduit sur 3 parcelles distinctes pour une surface totale cumulée de 3 ha environ. Sur chacune de ces parcelles, on retrouvait en principe 10 individus de 10 descendances différentes (soit 100 individus) pour chacune des provenances.

- Parallèlement, en **1994**, 9 fruits d'arbres différents ont été collectés à **Koumac**, dans le Nord de Grande Terre. Les graines ont été mesurées puis plantées. Les feuilles de seulement 4 plantules ont été mesurées.
- En **2003**, 20 fruits par arbre ont été collectés sur 22 jeunes arbres des 4 provenances (3 à Ouen Toro, 8 à Maré, 7 à Ouvéa et 4 à l'île des Pins), choisis aléatoirement dans l'essai Kaddour, et leurs graines ont été mesurées en longueur et largeur.
- En **2004**, un petit nombre de fruits a été collecté dans la population de **Pindai** et a été semé en pépinière. Les feuilles des arbres juvéniles ont là encore été mesurées. Une information sur la taille de feuilles juvéniles mesurées à la pépinière de Nouméa a pu être obtenues pour la provenance de **Païta**.
- Enfin en **2005**, 280 fruits ont été collectés sur 8 arbres dans la population de **Païta**, et 100 dans la population de **Pindai** sur un nombre d'arbres non défini. Leurs graines ont été mesurées pour la largeur et la longueur et plantées en pépinière.

Le tableau récapitulatif 3.a. ci-dessous présente les échantillons et leurs origines (X : nombre d'arbres inconnus, m : seule la moyenne est connue, données individuelles non disponibles)

Population	Graines récoltées <i>in situ</i>	Nb arbres dont les feuilles juvéniles ont été mesurées	Graines récoltées sur descendance essai Kaddour en 2003
Ouen Toro	} 255 sur X arbres ( <i>m pour chaque pop</i> ) en 1994 *	28 en 1994	56 sur 3 arbres
Maré		28 en 1994	160 sur 8 arbres
Ouvéa			125 sur 7 arbres
Ile des Pins		45 en 1994	80 sur 4 arbres
Koumac	9 sur 9 arbres ( <i>m</i> ) en 1994	4 ( <i>m</i> ) en 1994	
Pindai	100 sur X arbres en 2005	X ( <i>m</i> ) en 2004	
Païta	280 sur 8 arbres en 2005	X( <i>m</i> ) en 2004	

\* : pas d'information sur le nombre de graines par île



Bien que les échantillons de Koumac, Pindaï et Païta n'aient pas été inclus dans l'essai de provenances, ils ont été conservés pour avoir une idée des tendances morphologiques sur l'archipel.

### 3.2. Méthode d'analyse de la variabilité

- **Comparaison de moyennes**

Pour les données individuelles (graines récoltées en 2003 dans l'essai de Kaddour, en 2004 à Pindaï et en 2005 à Païta et feuilles juvéniles mesurées dans l'essai), nous avons calculé la moyenne de chaque caractère au niveau de chaque population sans tenir compte du déséquilibre dû au nombre de graines différent pour chaque arbre, celui-ci étant peu prononcé.

Pour les feuilles juvéniles mesurées en 1994 sur les jeunes plants avant la mise en place de l'essai Kaddour et les graines mesurées en 2003 sur les arbres de 4 provenances de l'essai Kaddour, nous avons effectué une comparaison de moyennes par un test de Bonferonni, après une analyse de variance à un facteur (effet île) par la procédure ANOVA de SAS (1990) selon le modèle à effet fixe suivant :

$$Y_{ij} = \mu + P_i + R_{ij}$$

$Y_{ij}$  : mesure sur l'individu  $j$  issu de l'île  $i$ ,

$P_i$  : effet de la population  $i$ , considéré comme effet fixe ( $i$  variant de 1 à 3 pour les feuilles et de 1 à 4 pour les graines)

$R_{ij}$  : l'effet résiduel

- **ACP**

Afin de distinguer les relations entre variables analysées et de voir éventuellement si ces variables permettaient de discriminer les populations, nous avons réalisé une Analyse en Composantes Principales sur l'ensemble des données (moyennes par population) sur les graines récoltées en milieu naturel et les feuilles juvéniles.

Les variables analysées étaient les traits quantitatifs précédemment cités (longueur et largeur des feuilles juvéniles et des graines, ainsi que le rapport allométrique longueur/largeur), auxquelles nous avons ajouté des variables supplémentaires à savoir les caractéristiques de sol, la moyenne annuelle de pluie, et le nombre de mois secs afin d'illustrer les relations entre caractéristiques des populations définies par les traits biologiques et par les conditions



abiotiques. Rappelons que les mesures des caractéristiques climatiques et édaphiques ne sont pas extrêmement précises, ayant été obtenues par des atlas et cartes géologiques pour le sol, par des moyennes météorologiques entre 1971 et 2000 pour la pluviométrie et le nombre de mois secs. Les analyses ont été conduites en utilisant le logiciel XLstat (Addinsoft, 2005).

- **Coefficient de corrélation**

Afin de connaître plus précisément les relations entre les variables allométriques et les variables abiotiques, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Pearson entre elles. Ceci n'a été possible qu'avec les variables abiotiques « pluviométrie » et « nombre de mois secs ». Pour la variable « type de sol », de type qualitatif, nous avons jugé non pertinent de mener une ANOVA car seules Ouvéa et Maré présentent le même type de sol et ont des caractéristiques de feuilles similaires (cf. résultats), les autres populations présentent des types de sols différents les uns des autres.

- **CAH**

Une classification ascendante hiérarchique (CAH) a été construite afin de visualiser la disposition relative des îles selon les critères quantitatifs précités, en utilisant là encore XLstat. Cette méthode consiste à agréger progressivement les individus selon leur ressemblance, mesurée à l'aide d'un indice de similarité ou de dissimilarité. Ici la dissimilarité utilisée est la distance euclidienne et l'agrégation est faite selon la méthode de Ward (1963). L'algorithme commence par rassembler les couples d'individus les plus ressemblants, puis à agréger progressivement les autres individus ou groupes d'individus en fonction de leur ressemblance, jusqu'à ce que la totalité des individus ne forme plus qu'un seul groupe. La CAH produit un arbre binaire de classification (dendrogramme), dont la racine correspond à la classe regroupant l'ensemble des individus.

- **Détermination des composants de la variance**

Les données collectées sur l'essai de Kaddour ont permis d'estimer les composants de la variance (variation entre îles, entre populations à l'intérieur des îles, et une variation d'erreur) avec la procédure VARCOMP et la méthode REML de SAS (1990) en utilisant le modèle aléatoire suivant :

$$Y_{ij} = \mu + P_i + R_{ij}$$

$Y_{ij}$  : mesure sur l'individu j issu de la population i,

**Tableau 3.1a** : Caractéristiques morphologiques **des feuilles juvéniles** mesurées sur les jeunes plants avant l'installation de l'essai **Kaddour en 1994**

Variable	N	Moyenne	Minimum	Maximum	coef. Variation
Lonf (cm)	101	5.25	2.97	9.03	28.74
Larf (cm)	101	0.63	0.16	1.47	56.50
Rapf	101	13.13	3.00	44.50	79.80

N : nombre total d'individus le nombre de feuilles par individu varie de 5 à 25

Lonf : longueur de la feuille

Larf : largeur de la feuille

Rapf : rapport longueur sur largeur

**Tableau 3.1b** : comparaison des moyennes des provenances présentes dans l'essai de Kaddour (**échantillon de 1994**) pour les caractères liés à la morphologie **des feuilles juvéniles (mesurées sur jeunes plants en 1994)**.

p : probabilité liée au test de Fisher de l'analyse de variance en modèle à effet fixe

(a, b, c, d) identifiant des groupes pour la comparaison de moyennes par la méthode de Bonferroni

Ile	N	lonf (cm)	larf (cm)	rapf
		P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Maré	28	4.23 c	1.10 a	3.87 c
Ouen Toro	28	7.18 a	0.38 c	27.07 a
Ile des Pins	45	4.91 b	0.53 b	10.21 b

N : nombre d'individus mesurés, le nombre de feuilles par individu varie de 5 à 25

Lonf : longueur de la feuille

Larf : largeur de la feuille

Rapf : rapport longueur sur largeur

$P_i$  : effet de la population  $i$ , considéré comme effet aléatoire de variance  $\sigma_p^2$  et d'espérance nulle

$R_{ij}$  : effet résiduel de variance  $\sigma_{wp}^2$  et d'espérance nulle

L'héritabilité ( $H^2$ ) des traits a été établie en utilisant la méthode classique (Falconer and McKay 1996) en la calculant sur la base de la moyenne des populations :

$$H^2 = \sigma_p^2 / (\sigma_p^2 + \sigma_{wp}^2)$$

Où  $\sigma_p^2$  est la variance entre populations et  $\sigma_{wp}^2$  la variance à l'intérieur des populations.

Nous avons aussi calculé le  $Q_{st}$  (Spitze, 1953) qui est un indice de différenciation analogue au  $F_{st}$  de Wright (1951) :

$$Q_{st} = \sigma_p^2 / (\sigma_p^2 + 2 \sigma_{wp}^2)$$

Chez les espèces diploïdes et dans le cas d'un trait ayant une variation génétique purement additive et à l'équilibre de liaison (nous ferons ces dernières hypothèses dans le cas du Santal), le  $Q_{st}$  devrait prendre la même valeur que le  $F_{st}$  s'il était estimé à partir de fréquences alléliques aux loci des traits quantitatifs (Lynch et Spitze, 1994 ; Latta , 1998). Ainsi, si un trait quantitatif est neutre sélectivement, c'est-à-dire que sa variation observée est seulement attribuable à la dérive, on s'attend à ce que le  $Q_{st}$  pour le trait observé soit très voisin du  $F_{st}$ . Inversement, si la variation d'un caractère reflète une adaptation à un environnement variable selon les populations, le  $Q_{st}$  devrait être supérieur au  $F_{st}$ . La comparaison  $Q_{st}/F_{st}$  permet donc de tester l'existence d'une sélection diversifiante pour un caractère quantitatif (Merila, 2001). Afin d'effectuer cette comparaison, nous avons calculé le  $F_{st}$  correspondant aux populations étudiées pour les traits potentiellement liés à l'adaptation en utilisant la même méthode que dans le chapitre précédent et en utilisant GENEPOP (Raymond et Rousset, 1995).

### **3.3. Des résultats montrant une nette différenciation entre provenances**

Les feuilles juvéniles présentent une morphologie très variable au sein de *S. austocaledonicum* (tableau 3.1a), davantage pour la largeur de la feuille avec un coefficient de variation de 56.50%. Le rapport allométrique est en conséquence très élevé et montre un coefficient de variation très fort (79.80 %).

Les feuilles juvéniles de Ouen Toro sont plus effilées que celles de l'île des Pins, elles mêmes plus effilées que celles de Maré (tableau 3.1b). Les valeurs moyennes de chaque population sont significativement différentes comme le soulignent l'analyse de variance et le test de



**Tableau 3.2a** : Caractéristiques morphologiques **des graines** mesurées après récolte en **2003** dans l'essai **Kaddour**

Variable	N	Moyenne	Minimum	Maximum	coef. Variation
longr (cm)	22	0.93	0.73	1.04	9.17
lagr (cm)	22	0.78	0.57	0.91	13.79
rapgr	22	1.19	1.08	1.45	7.35

N : nombre total d'individus, le nombre de graines par individu varie de 3 à 20

Longr : longueur de la graine

Lagr : largeur de la graine

Rapgr : rapport longueur sur largeur

**Tableau 3.2b** : comparaison des moyennes des provenances présentes dans l'essai de Kaddour (**échantillon de 2003**) pour les caractères liés à la morphologie **des graines mesurées en 2003**

p : probabilité liée au test de Fisher de l'analyse de variance en modèle à effet fixe

(a, b, c, d) identifiant des groupes issus de la comparaison de moyennes par la méthode de Bonferroni

Ile	N	longr (cm)	lagr (cm)	rapgr
		P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001
Maré	8	0.99 a	0.88 a	1.14 b
Ouen Toro	3	0.76 b	0.59 c	1.29 a
Ouvéa	7	0.94 a	0.80 a	1.17 b
Ile des Pins	4	0.89 a	0.68 b	1.31 a

N : nombre d'individus mesurés, le nombre de graines varie de 3 à 20

Longr : longueur de la graine

Lagr : largeur de la graine

Rapgr : rapport longueur sur largeur

Bonferonni (tableau 3.1b). Cette observation est illustrée par la figure 3.2a où les populations de Maré, de l'île des Pins, et de Ouen Toro se distinguent nettement. Les valeurs de Pindaï, Païta et Koumak dont nous ne disposons que des moyennes, semblent plus proches de celles de Ouen Toro.

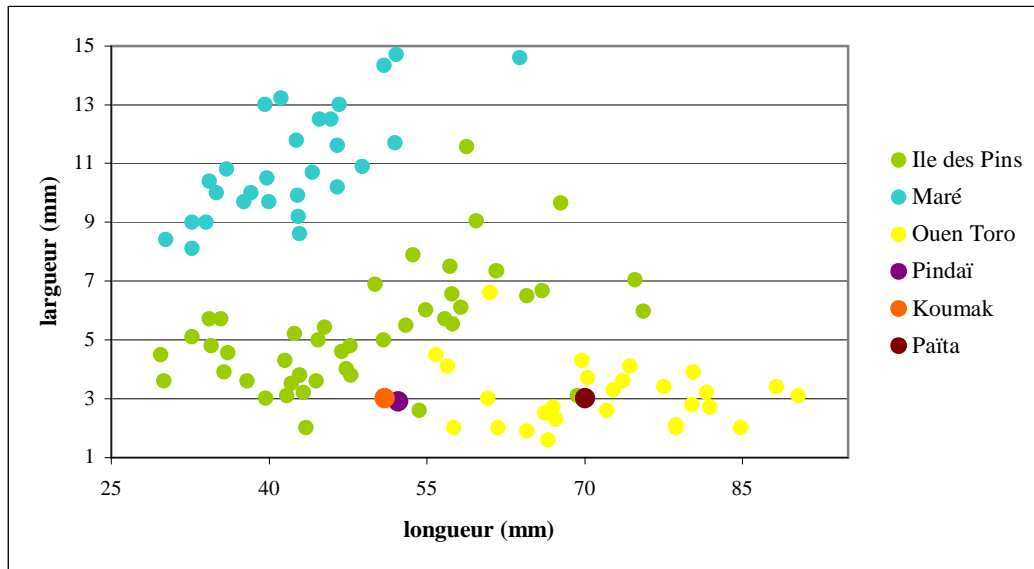
L'analyse de la variabilité chez les feuilles adultes permet de confirmer l'observation selon laquelle ces dernières sont moins variables que les feuilles juvéniles. En effet, comme le montre la figure 3.2b présentant les variations de morphologie des feuilles adultes récoltées en 1994, les nuages de points sont davantage confondus que dans la figure 3.2a, en particulier la population de Ouen Toro se positionne dans le nuage des Iles Loyautés représenté par les îles de Maré et Lifou, alors qu'elle s'en distinguait nettement sur la base des feuilles juvéniles (figure 3.2a).

La variation de la taille des graines est moins marquée que celle des feuilles comme le soulignent les coefficients de variation (tableau 3.2a). Le rapport longueur/largeur est par ailleurs très faible par rapport à celui des feuilles indiquant une contrainte allométrique très marquée.

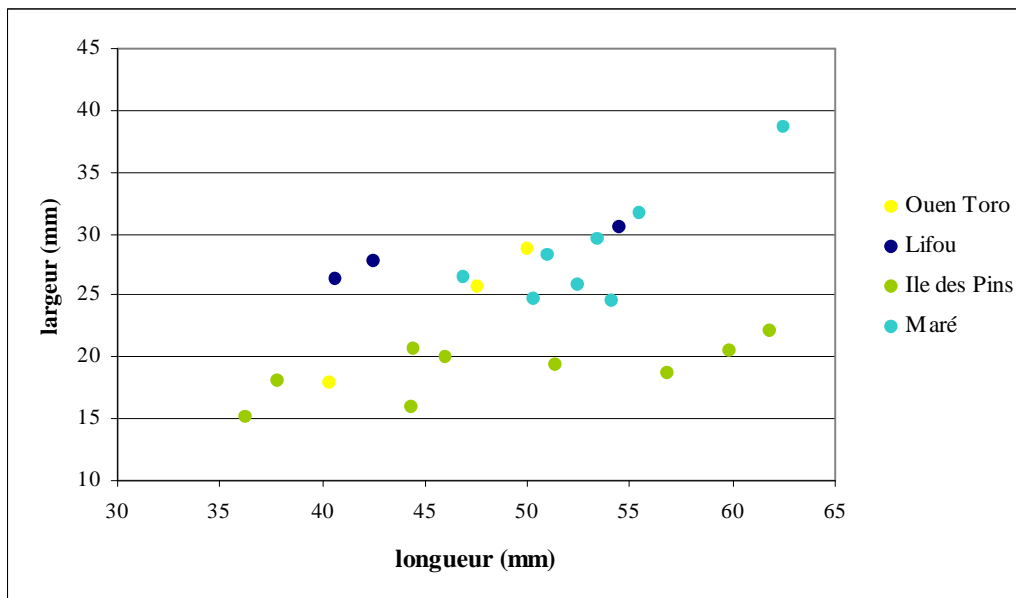
Les résultats de l'analyse de variance (tableau 3.2b) montrent une différence nette entre les îles Loyauté, l'île des Pins et Grande Terre. Les valeurs moyennes sont aussi significativement différentes mais la largeur discrimine plus fortement les populations que la longueur. Ces comparaisons tendent à souligner le regroupement des îles Loyauté par rapport aux populations de Grande Terre. La figure 3.3a montre en outre que les moyennes calculées à partir des graines récoltées *in situ* sont très cohérentes avec les moyennes estimées dans l'essai Kaddour où l'effet de l'origine n'est plus confondu avec les effets environnementaux.

L'Analyse en Composantes Principales (figure 3.4) intégrant les données mesurées dans l'essai et les données mesurées en milieu naturel (tableau 3.3) montre que 98% de la variation est expliquée par les 2 premiers facteurs. Le premier facteur (88% de la variation totale), principalement expliqué par la taille des graines et les feuilles, oppose les populations avec une grande longueur de feuilles aux populations avec une grande largeur de feuilles et de graines, et une grande longueur de graines. Cet axe permet de différencier les populations des îles Loyauté (Ouvéa, Maré) des populations de Grande Terre (Ouen Toro, Païta, Pindaï et Koumac), la population de l'île des Pins occupant une position intermédiaire. Cette classification est confirmée par l'Analyse Hiérarchique (figure 3.5) qui isole les îles d'Ouvéa et Maré des autres populations. Ainsi comme l'indiquaient les analyses précédentes, les populations de Grande Terre sont caractérisées par des feuilles juvéniles plus étroites et plus

**Figure 3.2.a** Taille des **feuilles juvéniles** issues des plantules élevées en pépinière en provenance de Maré, l'île des Pins, Ouen Toro, Koumak, Païta et Pindaï. Pour ces trois derniers, nous ne disposons que de la moyenne sur l'ensemble des individus mesurés.



**Figure 3.2.b** Taille des **feuilles adultes** issues de récoltes effectuées en 1994 sur des individus en provenance de Maré, Lifou, l'île des Pins et Ouen Toro (arbres mères ayant fournis les graines pour la mise en place de l'essai Kaddour).



longues (linéaires à lancéolées) que celles des îles Loyauté à feuilles plus larges et plus courtes (ovales-elliptiques), et par de plus petites graines qu'aux Loyautés.

Les paramètres climatiques sont dans l'ensemble significativement corrélés aux variables mesurées (tableau 3.4). La pluviométrie est positivement corrélée avec la largeur des feuilles ( $r= 0.77$ ,  $p<0.05$ ), et négativement avec le rapport allométrique longueur / largeur des feuilles ( $r= -0.80$ ,  $p<0.05$ ), et est positivement corrélée avec la longueur ( $r= 0.83$ ,  $p<0.05$ ) et la largeur ( $r=0.78$ ,  $p<0.05$ ) des graines. Le nombre de mois secs n'est pas corrélé de façon significative avec les variables.

La variance entre populations ( $\sigma_p^2$ ) est significativement différente de zéro au niveau 0.1% pour chaque trait (tableau 3.5). La composante « entre populations » est plus forte que celle « intra-population » et représente environ 80% de la variation totale exprimée sous forme d'héritabilité, excepté pour le ratio longueur/largeur des graines.

Le  $Q_{st}$  calculé (tableau 3.5) est supérieur au  $F_{st}$  pour les populations étudiées dans ce chapitre ( $F_{st}= 0.37$ ) pour l'ensemble des traits mesurés sur les feuilles ( $Q_{st}$  compris entre 0.54 et 0.74), et pour la longueur et largeur des graines ( $Q_{st}$  respectivement de 0.55 et 0.74). En revanche pour le ratio longueur / largeur des graines, le  $Q_{st}$  ( $Q_{st}= 0.27$ ) est inférieur au  $F_{st}$ . Ces résultats semblent indiquer un effet de la sélection sur l'ensemble des caractères sauf le ratio longueur/largeur des graines.

### **3.4. Pourquoi une telle variabilité ?**

Les mesures des caractères à valeur adaptative « graines » et « feuilles juvéniles » sur l'ensemble de l'archipel montrent une forte différenciation entre les îles. Ces différences sont marquées à la fois pour les caractères mesurés sur le terrain (graines) et pour les caractères mesurés sur des individus élevés en conditions contrôlées (graines et feuilles juvéniles), ce qui tend à prouver que cette variation est d'origine génétique. En effet, l'étude en milieu contrôlé permet de séparer les effets génétiques et environnementaux et confirme l'existence d'une forte héritabilité qui atteint 85% pour la largeur des graines et des feuilles juvéniles.

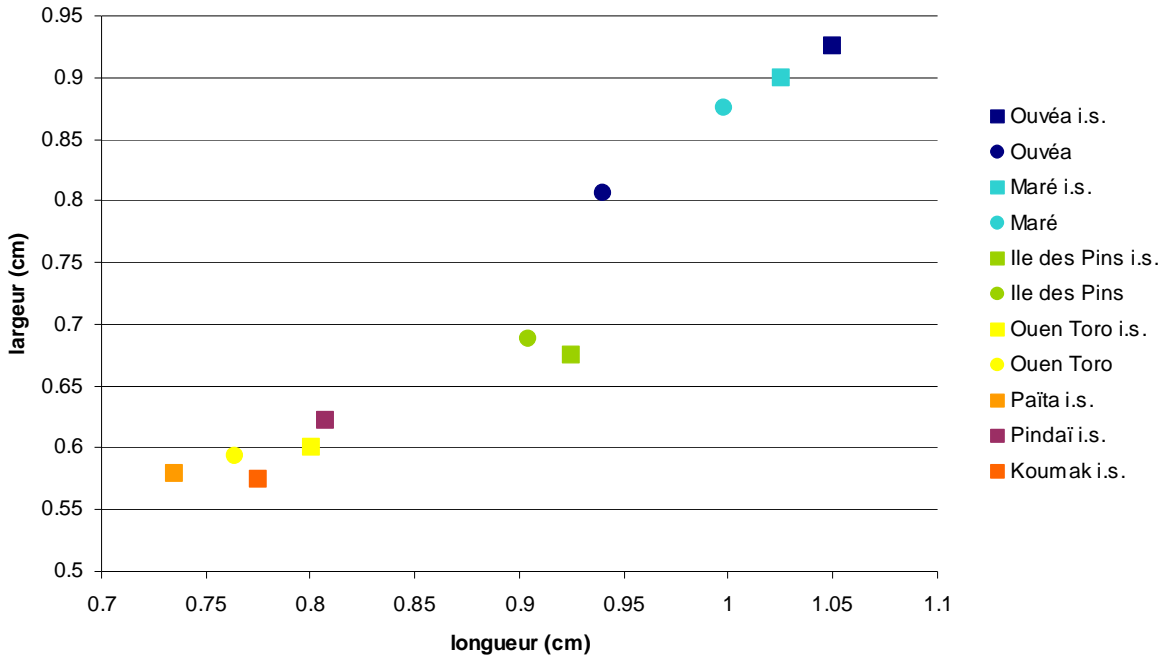
La question est de savoir si cette variation d'origine génétique est expliquée par les effets de la sélection naturelle ou par les effets de la dérive génétique. La dérive génétique pourrait en effet intervenir car les microsatellites nucléaires mettent en évidence la même différenciation entre Loyautés et Grande Terre que les caractères étudiés ici. Mais la sélection naturelle joue aussi un rôle prédominant, comme le prouve le fait que les  $Q_{st}$  sont supérieurs aux  $F_{st}$  pour

**Figure 3.3. Taille des graines :**

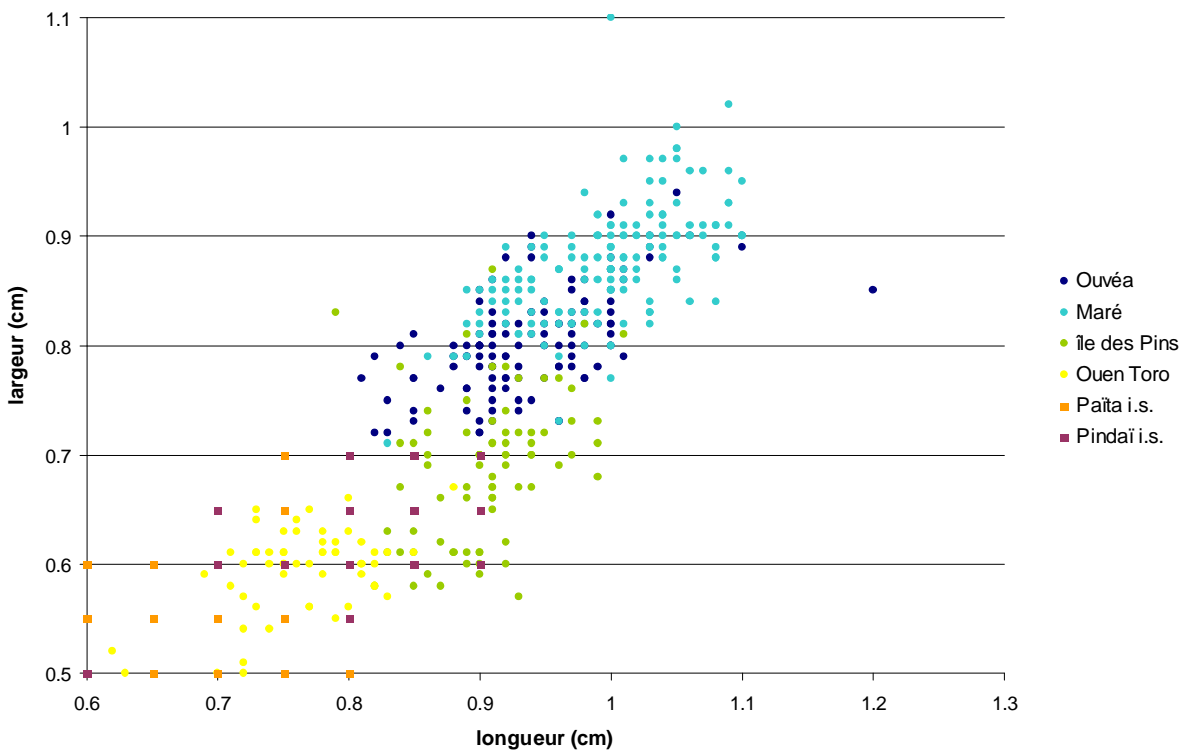
a/ moyennes par population, i.s. : récolte *in situ*, les autres ont été récoltées sur des arbres issus de l'essai Kaddour.

b/ tailles individuelles pour les individus récoltés *in situ* (i.s.) et dans l'essai Kaddour

a/



b/



l'ensemble des caractères mesurés, sauf le ratio longueur/largeur des graines. Ceci tend à prouver qu'il ne s'agit pas de caractères purement neutres et donc soumis uniquement à la dérive, mais qu'ils sont bien aussi soumis à sélection.

Il faut rappeler que, pour l'estimation des  $Q_{st}$ , nous avons fait l'hypothèse que la variation génétique inter et intra population était purement additive, ce qui reste à prouver dans le cas du Santal. Par ailleurs l'estimation de la variance intra population est une variance qui inclut des effets génétiques et des effets environnementaux ce qui entraîne un biais supplémentaire. Ce dernier aurait cependant tendance à minimiser le  $Q_{st}$ , la valeur estimée pourrait donc être inférieure à celle calculée avec une estimation plus juste de la variance additive intra-population.

Ainsi la dérive agit probablement en partie sur cette variabilité, mais il y a aussi un phénomène d'adaptation locale non négligeable. Cependant, pour le ratio longueur/largeur des graines cette conclusion n'est pas valable. Ceci peut s'expliquer par une contrainte allométrique des graines ; autrement dit le ratio moyen longueur/largeur apparaît comme relativement constant chez cette espèce (tableau 3.2a).

Quelles sont les pressions de sélection pouvant s'appliquer aux caractères « feuilles » et « graines » ?

Dans notre étude nous ne disposons pas de la surface foliaire traditionnellement mesurée dans les études écologiques, mais compte tenu de la morphologie des feuilles, et des mesures de longueur et largeur nous pouvons sans conteste parler d'une diminution de surface foliaire entre les Loyauté et la Grande Terre. Or la surface des feuilles tend à diminuer avec : l'augmentation de l'altitude (Cordell *et al.*, 1998 ; Hovenden et Vander Schoor, 2003), une diminution de la température annuelle (Wolfe, 1995), ou de la pluviométrie (Stone et Bacon, 1995) et une fertilité du sol plus faible (Cunningham *et al.*, 1999). Evaluons ces hypothèses une à une dans le cas du Santal :

- L'altitude ne semble pas intervenir dans la variabilité observée. En effet *S. austrocaledonicum* n'est pas trouvé au-delà de 300m d'altitude et a principalement été récolté dans des zones de basse altitude. Cependant pour le Santal de Polynésie, croissant à la fois à basse altitude et sur les crêtes de montagnes, l'altitude serait un des facteurs essentiels de variation de la taille des feuilles (Butaud, comm. pers.).
- La température annuelle n'apparaît pas non plus comme un facteur déterminant, celle-ci étant relativement homogène dans toutes les stations de récolte (22 à 24°C).

**Tableau 3.3 :** Récapitulatif des moyennes par population pour les tailles des feuilles juvéniles et des graines utilisées pour l'ACP, et rappel des caractéristiques abiotiques des populations. (types de sol: 1= Sols calcimagnésiques sur calcaires, 2=Sables coralliens consolidés, 3 = Shistes et calcaires, 4= Grès et pélites, 5= Alluvions anciennes, 6= Sols fersialitiques)

Population	feuilles juvéniles			graines			pluviométrie (mm/an)	nombre mois secs	type de sol
	longueur	largeur	ratio longueur / largeur	longueur	largeur	ratio longueur / largeur			
Ouvéa	4.23	1.1	3.85	0.94	0.8	1.17	1440	3.7	1
Maré	4.23	1.1	3.87	0.99	0.88	1.13	1450	2.4	1
Ile des Pins	4.91	0.53	10.21	0.89	0.69	1.31	1460	2.3	2
Ouentoro	7.18	0.38	27.08	0.76	0.59	1.29	1058	3.8	3
Païta	7	0.3	23.33	0.74	0.58	0.78	1165	3.8	4
Pindai	5.23	0.29	18.03	0.78	0.6	1.3	893	5.4	5
Koumac	5.1	0.3	17	0.8	0.6	1.32	1200	4.4	6

Remarque : pour Ouvéa, la valeur étant manquante il a été décidé de lui donner une valeur identique à Maré, choix guidé par les observations de terrain (R Nasi communication personnelle)

- La pluviométrie en revanche apparaît positivement corrélée avec la largeur des feuilles juvéniles, et négativement avec le ratio longueur/largeur. Il semble donc que la taille des feuilles décline lorsque la pluviométrie devient faible. Plusieurs auteurs ont déjà reporté de telles observations (notamment Fonseca *et al.*, 2000). La réduction de la surface des feuilles permet en effet de limiter la transpiration dans un environnement sec et plus exposé aux radiations (Khurana et Singh, 2001, McDonald *et al.*, 2003). Il semble donc probable que la faible surface des feuilles juvéniles constitue une adaptation à la pluviométrie faible de la côte Ouest de Grande Terre.
- Le type de sol, représentatif de sa richesse en nutriments, pourrait être lui aussi un facteur explicatif potentiel de la taille des feuilles (Mc Donald *al.*, 2003). Dans l'archipel de Nouvelle-Calédonie, les sols coralliens des îles Loyauté sont beaucoup plus pauvres en éléments nutritifs tels que le Phosphate, que ceux de Grande Terre. Le tableau 3.1 montre justement que dans les îles Loyauté les feuilles juvéniles possèdent des caractéristiques particulières, elles sont moins longues et plus larges que les autres.

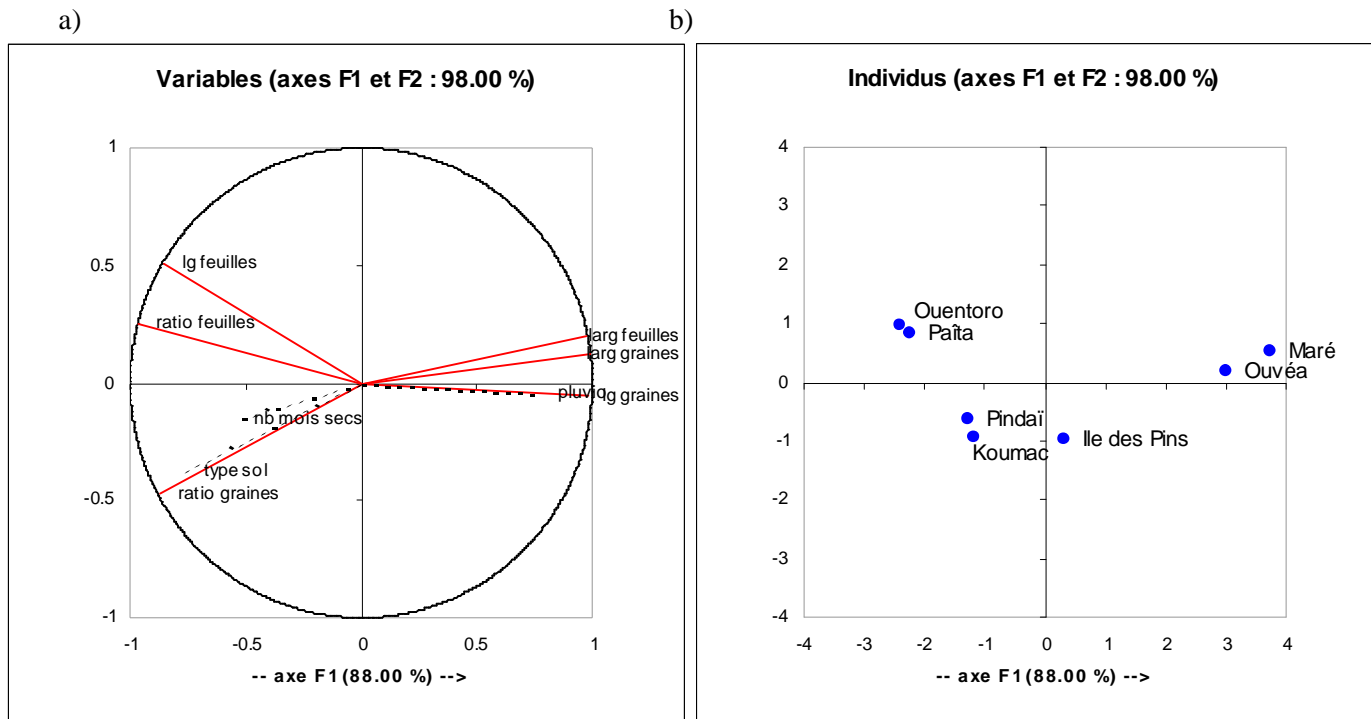
De même, de nombreux facteurs peuvent être impliqués dans la variation géographique de la taille des graines. Notamment la température (Fitter et Hay, 2002), la radiation solaire (Murray *et al.*, 2004), la pluviométrie (Murray et Gill, 2001), le type de sol et les complexes de dispersion des graines.

- Comme pour la taille des feuilles juvéniles, la température n'apparaît pas comme un facteur discriminant dans l'archipel.
- L'ensoleillement est susceptible de varier selon les localités, mais beaucoup plus du fait de la pluviométrie, très variable dans l'archipel, que de la latitude. Pour cette dernière, nos résultats montrent une corrélation positive significative avec les caractéristiques de longueur et de largeur des graines. Plusieurs auteurs reportent l'augmentation de la taille des graines dans les zones plus humides, notamment Carlquist (1980) dans une étude sur la variation des graines de *Pittosporum spp* et *Pritchardia ssp* à Hawaii où l'auteur observait que les graines étaient plus grandes dans les zones humides que dans les zones sèches, et l'expliquait par une adaptation évolutive pour l'accumulation de réserves dans un environnement ombragé où la compétition est forte (une pluviométrie annuelle abondante engendrant une végétation importante). Dans notre cas, comme attendu, on constate une plus grande taille des graines dans les îles Loyauté, où la pluviométrie est plus forte que sur la côte Ouest de Grande Terre et la végétation plus abondante. Cette plus grande taille constituerait

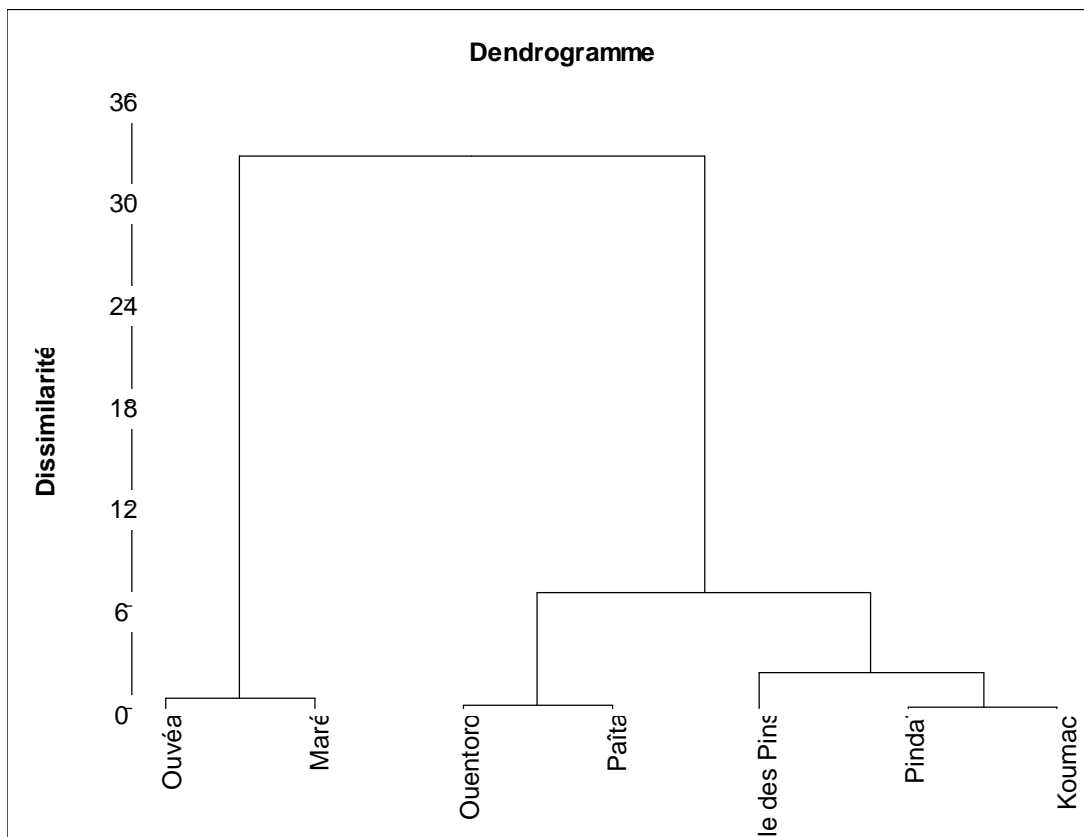


**Figure 3.4:** résultats de l'Analyse en Composantes Principales avec les variables de taille des feuilles et des graines ainsi que le ratio longueur/largeur. Les variables abiotiques sont intégrées dans l'analyse en tant que variables supplémentaires.

- a) Explication des axes par les variables actives et positionnement des variables supplémentaires (sol, nombre de mois secs et pluviométrie).
- b) Graphique des 2 axes principaux des 2 premiers composants des 7 populations basés sur la morphologie des graines et des feuilles juvéniles.



**Figure 3.5 :** Dendrogramme issu de la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)



donc un avantage compétitif dans les Loyautés, mais serait moins utile à Grande Terre où la végétation est moins dense. De nouveaux échantillons seraient nécessaires pour affirmer nos conclusions, la collecte de fruits de la population de Hienghène, génétiquement proche des populations de la côte Ouest de Grande Terre (cf chapitre 2) et où la pluviométrie est similaire aux îles Loyauté pourrait apporter un nouvel éclairage sur ces hypothèses.

- Comme pour la taille des feuilles juvéniles, le type de sol semble intervenir dans la variabilité de la taille des graines. Plusieurs études rapportent une corrélation positive entre la taille des graines et la survie de la plantule dans les premiers stades d'établissement particulièrement, en liaison avec les conditions environnementales du milieu, les graines de grosse taille étant favorisées en conditions difficiles, sur des sols pauvres par exemple (Winn 1988, Wood et Morris, 1990). Les tableaux 3.1, 3.2 et 3.3 montrent des graines de plus grande taille (longueur et largeur) dans les îles Loyauté où les sols sont de plus faible qualité. Il se pourrait donc que le sol, tout comme la densité de végétation liée à la pluviométrie, exerce une pression de sélection sur la taille des graines pour des graines de plus grosse taille que sur Grande Terre.
- L'effet du disperseur a déjà été prouvé par de nombreuses études, notamment celle de Lord (2004) portant sur le Pacifique. En effet la taille des graines est corrélée positivement avec la taille des animaux qui les dispersent (Alcantara et Rey, 2003 ; Jordano, 1995), ces derniers apparaissant donc comme des agents sélectifs. A ce jour il n'existe pas de liste précise des animaux disséminant les graines de Santal en Nouvelle-Calédonie, tout au plus a-t-on observé la présence d'oiseaux, en particulier des Columbidae tel *Columba vitiensis*. Les chauves-souris pourraient aussi intervenir dans la dissémination (Cox *et al.*, 1991), cependant selon Richards (1990) les chauves-souris seraient incapables d'avaler des graines au-delà de 3.7 x 3.2 mm, et ne transporteraient - sans les ingérer - les graines qu'à partir d'une taille minimale de 40 mm de diamètre. Le Santal ayant des graines d'une largeur minimale de 5 mm, et une longueur maximale de 12 mm, elles ne pourraient donc pas être véhiculées par ces animaux. En revanche, les guildes d'oiseaux pourraient être différentes sur les îles Loyauté et sur Grande Terre imposant ainsi une pression de sélection sur la taille des graines. Cette différence de guildes d'oiseaux pourrait s'expliquer par des extinctions différentes entre Grande Terre et les Loyautés menant à ces répartitions d'espèces d'oiseaux différentes ; cette hypothèse est supportée par l'étude de Mc Conkey *et al.* (2002) qui reporte une extinction massive des animaux dans les îles du Pacifique

**Tableau 3.4 :** Coefficients de corrélation entre les mesures des feuilles juvéniles et des graines et les variables climatiques : pluviométrie et nombre de mois secs. ns : corrélation non significative. \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001

		pluviométrie	nombre de mois secs
<b>feuilles</b>	longueur	-0.596 ns	0.258 ns
	largeur	0.767 *	-0.551 ns
	ratio longueur/largeur	-0.792 *	0.501 ns
<b>graines</b>	longueur	0.826 *	-0.657 ns
	largeur	0.779 *	-0.616 ns
	ratio longueur/largeur	-0.573 ns	0.431 ns

**Tableau 3.5 :** Estimation des composants de la variance pour les feuilles juvéniles et les graines, avec les individus issus de l'essai.

$S^2_p$  : variance entre populations,  $S^2_{wp}$  : variance intra-population,  $H^2$  : héritabilité basée sur la moyenne par population.  $Q_{st}$  : indice de différenciation sur la base des caractères morphologiques, dont la méthode de calcul est comparable à celle du **Fst** qui est de **0.37** entre les populations étudiées ici.

Le ratio est le rapport de la longueur sur la largeur pour les feuilles juvéniles ou les graines.

Remarque : les tests de Fisher ont montré que la variance  $S^2_p$  : variance entre populations était significativement différente de zéro pour l'ensemble des caractères.

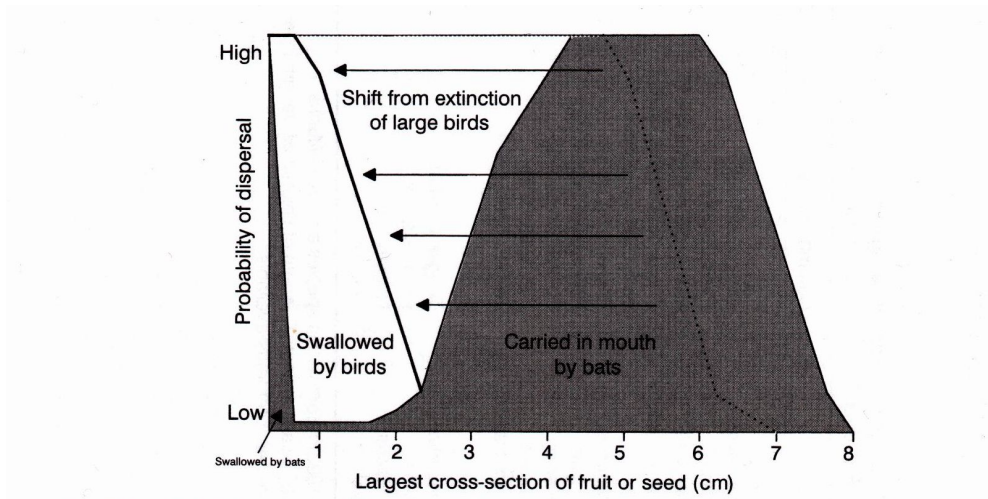
Paramètre	Feuilles juvéniles			Graines		
	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Ratio	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Ratio
$\sigma^2_p$	234.12	16.60	142.74	0.01	0.02	0.01
$\sigma^2_{wp}$	100.34	2.93	29.24	0.00	0.00	0.01
$H^2 = \sigma^2_p / (\sigma^2_p + \sigma^2_{wp})$	0.7	0.85	0.83	0.71	0.85	0.42
$Q_{st} = \sigma^2_p / (\sigma^2_p + 2\sigma^2_{wp})$	0.54	0.74	0.71	0.55	0.74	0.27

depuis l'arrivée de l'Homme, particulièrement des guildes d'oiseaux et de chauves-souris disperseurs, imposant ainsi une pression de sélection pour des graines de petite taille, auxquelles correspondent plus d'agents disperseurs (figure 3.6). Cette hypothèse étaye les conclusions antérieures de Carlquist (1980) qui remarque une dispersion plus efficace des petites graines par les oiseaux, qui ingèrent préférentiellement les petits fruits.

L'étude menée par Hallé en 1988 avait déjà abouti à la conclusion qu'il existait de fortes différences phénotypiques entre provenances. Concernant la variété supposée *minutum* récoltée à Koumac, l'auteur déduisait que les différences morphologiques avec les autres populations de Grande Terre n'étaient pas significatives, et rejetait ainsi l'existence de cette variété. D'autre part, il observait que la variété type *austrocaledonicum* présentait d'importantes différences morphologiques entre les individus de l'île des Pins et ceux des Loyautés, recommandant ainsi la distinction de 2 variétés. Malgré l'absence d'individus de la variété *austrocaledonicum* en provenance de Grande Terre dans son étude, les échantillons d'herbiers et la taille des fruits laissaient penser que la variété *austrocaledonicum* de l'île des Pins serait la même que celle sur Grande Terre et serait différente de celle des îles Loyauté. Les données complémentaires apportées par notre étude permettent de confirmer l'existence de différences morphologiques entre l'île des Pins et les Loyautés. Cependant, la ressemblance entre l'île des Pins et Grande Terre n'est pas manifeste, les populations de Pindaï et Païta ne se situant pas complètement dans le nuage de données de l'île des Pins (figures 3.2 et 3.3). Il semblerait donc qu'il existe, à la place d'une seule variété *austrocaledonicum*, 3 variétés botaniques : une sur Grande Terre, une sur l'île des Pins et une autre sur les Loyautés. Cependant, ce résultat nécessite la confirmation de botanistes, plus aptes à déterminer les limites de l'appellation de « variété ».

**Conclusion du chapitre 3 :** Bien que des données manquantes ne permettent pas d'obtenir un patron complet de la variation quantitative dans toutes les populations de Nouvelle-Calédonie, nous pouvons faire l'hypothèse que la variation de la morphologie des graines et des feuilles résulte d'une adaptation aux conditions climatiques, et probablement au sol, aux agents de dispersion et à la dérive. Trois zones principales peuvent ainsi être définies : la côte Ouest de Grande Terre, l'île des Pins, et les îles Loyauté. Cette étude devra être complétée par des échantillons issus d'autres populations notamment Hienghène, Malhec et Lifou, mais idéalement, il faudrait recommencer un échantillonnage plus équilibré et

**Figure 3.6 :** Modèle présentant la probabilité de dispersion des graines ou des fruits en fonction de leur taille, par des chauves-souris et les oiseaux frugivores. L'aire grisée indique les tailles de graines dispersées par les chauves-souris, la ligne en pointillés indique les tailles dispersées par des grands pigeons éteints, la ligne pleine indique les tailles de graines dispersées par les oiseaux actuels. La différence entre la ligne pointillée et la ligne pleine indique les tailles de fruits qui ne sont plus dispersés par les oiseaux, après les extinctions massives de frugivores. Extraite de Mc Conkey *et al.* (2002) dans *Seed dispersal and Frugivory* (Levey *et al.*, 2002).



géoréférencé dans l'ensemble des îles. Les graines mesurées pourraient être semées dans un nouvel essai contrôlé avec des effectifs égaux pour chaque population, permettant d'estimer la variance génétique de manière plus rigoureuse et pouvoir ainsi estimer des paramètres comme le  $Q_{st}$ . Il serait aussi intéressant de mesurer d'autres paramètres pouvant être adaptatifs tels que la surface foliaire et le poids des graines, afin de vérifier nos conclusions.



## ***CHAPITRE 4***

### ***Analyse de la variabilité chimique des huiles essentielles***





## **4.1. Introduction**

### **4.1.1. Les composés secondaires des plantes**

#### **4.1.1.1. Un moteur évolutif longtemps dénigré**

Une revue bibliographique très complète sur les composés secondaires est présentée dans le travail d'Amiot (2005a). Nous en présenterons ici les grandes lignes.

Les composés secondaires des plantes sont utilisés par l'homme depuis l'antiquité pour leurs propriétés médicinales, culinaires ou odorantes et ont donc très tôt constitué un objet d'étude pour les naturalistes et les scientifiques. Toutefois, jusqu'aux travaux de Stahl (1888) montrant l'effet défensif d'un glucoside cyanogénique produit par une plante sur des escargots herbivores, ces composés étaient considérés comme n'ayant aucune fonction pour la plante, d'où leur qualificatif de « secondaires » par opposition au métabolisme « primaire » assurant la synthèse des molécules essentielles à la croissance et la physiologie de la plante. C'est seulement au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle que le rôle fonctionnel de ces composés est reconnu, avec les études de Fraenkel (1959) sur les modalités de choix des insectes phytophages, et d'Ehrlich et Raven (1964) développant l'hypothèse d'un rôle de défense vis-à-vis des herbivores, et donc d'une coévolution entre les plantes et les herbivores associés. Etant donnée la diversité des composés secondaires, ces derniers suggèrent l'existence d'une « course aux armements », les plantes synthétisant régulièrement de nouvelles molécules pour assurer leur défense, et les herbivores étant contraints de s'y adapter sous peine de disparaître (Pichersky, 2000). D'après la théorie des paysages adaptatifs (Wright, 1931 ; Simpson 1953) lorsqu'une nouvelle molécule défensive se diffuse dans une population végétale, les individus la synthétisant prospèrent et se diversifient dans cette nouvelle niche adaptative vierge d'agresseur. De même, lorsqu'une mutation intervient chez les agresseurs leur permettant de contourner la toxicité d'une plante, ils se trouvent dans une nouvelle niche adaptative où ils peuvent subir un processus d'« échappement et radiation » (Thompson, 1989 et 1994). Cependant, plutôt que d'une coévolution exclusivement entre une espèce végétale et une espèce de bioagresseur, il s'agirait plus certainement d'une coévolution diffuse ou coévolution de guildes, autrement dit l'impact d'un ensemble d'espèces sur un trait d'une autre espèce (Futuyama et Keese, 1992).

Ainsi les composés secondaires, autrefois appelés « déchets du métabolisme » et jugés inutiles pour la plante agiraient en fait comme un moteur évolutif majeur de la biodiversité. Cette



hypothèse fut finalement reconnue par Whittaker et Feeny (1971) qui, remarquant l'importance des substances chimiques sur les interactions entre espèces, initièrent une nouvelle branche de l'écologie : l'écologie chimique. La dernière pierre de cette théorie du rôle des composés secondaires fut apportée par Croteau (1972), qui montra que ces composés pouvaient être catabolisés, c'est-à-dire dégradés en molécules de plus faible taille en produisant une libération d'énergie utilisable par la plante. Cette constatation finit par convaincre les derniers sceptiques, et marqua le début de recherches intensives sur les fonctions de ces composés.

#### 4.1.1.2. Un rôle défensif coûteux – hypothèses évolutives

Les plantes sont des êtres vivants fixes, ne pouvant se mouvoir pour se défendre ou pour éviter des conditions de milieu défavorables. Contre les agresseurs, elles possèdent cependant un panel d'armes physiques (ex : épines) et chimiques (ex : substances toxiques, molécules de communication comme l'éthylène, etc.). De très nombreuses plantes présentent une toxicité pouvant être bactéricide ou fongicide (Dabbah *et al.*, 1970 ; Pellecuer *et al.*, 1976 ; Vokou *et al.*, 1984), insecticide ou insectifuge (Smith, 1966 ; Williams, 1970), ou encore simplement dissuasive sur les vertébrés herbivores (Freeland et Janzen 1974 ; Bryant *et al.*, 1991).

Les caractéristiques de cette toxicité ont été listées par Amiot (2005a) :

- spécifique (interaction protéine-cible spécifique) ou généraliste (par le biais de groupes fonctionnels présents sur une même molécule) (Wink, 2003).
- directe, si c'est une défense constitutive (cas des alcaloïdes), indirecte s'il s'agit d'une défense induite par la prédation (cas de l'HCN à partir de glucosides cyanogéniques), ou les deux à la fois comme pour les phénols (Levin, 1976).

Le mécanisme de production de molécules défensives a cependant un coût pour l'organisme qui les produit, l'énergie allouée à cette synthèse n'étant pas attribuée à la croissance ou la reproduction. La théorie de la défense optimale (Feeny, 1976 ; Rhoades et Cates, 1976) propose que le niveau de défense d'une plante évolue pour maximiser sa valeur sélective (Rhoades, 1979), tendant vers un équilibre entre défense, croissance et reproduction. Ainsi, une espèce souvent attaquée développerait des défenses nombreuses et coûteuses, et inversement pour une espèce peu attaquée.

Par la suite, des théories complémentaires intégrant le rôle de l'environnement et d'autres fonctions de la plante ont vu le jour. La théorie de l'équilibre carbone/nutriments ("*carbon/nutrient balance*" ou CNB) (Bryant *et al.*, 1983) propose que la disponibilité en



carbone et en nutriments influence leur allocation aux diverses fonctions de la plante, et donc notamment aux mécanismes défensifs. En outre, il y aurait deux sources de carbone pour la synthèse de composés secondaires, l'une fixe, génétiquement déterminée, l'autre variable lorsque les ressources disponibles satisfont les besoins en croissance et que l'excès de carbone est alloué à la défense (Tuomi *et al.*, 1991). Cependant cette idée a été plusieurs fois critiquée (Hamilton *et al.*, 2001). Cet intérêt pour les ressources a pourtant permis l'émergence d'une théorie complémentaire : celle du taux de croissance ("*growth rate*" ou GR, Coley *et al.*, 1985, Bazzaz *et al.*, 1987). Celle-ci avance que plus le taux de croissance est fort, plus le niveau de défense permettant de réaliser pleinement cette croissance maximale est faible. La théorie de l'équilibre carbone/nutriments enrichie de celle du taux de croissance permettent d'avancer que dans un environnement riche en ressources où les espèces les plus compétitives sont plastiques et peuvent avoir une croissance rapide, la proportion d'énergie allouée à la défense sera faible et induite.

La théorie de l'équilibre croissance/différenciation ("*growth/differentiation balance*" ou GDB) (Herms et Mattson, 1992) permet d'ailleurs de synthétiser ces deux dernières théories en tentant de prédire comment les plantes allouent globalement leurs ressources entre les processus de croissance d'une part, et ceux de spécialisation cellulaire (notamment ceux permettant la synthèse de composés secondaires) d'autre part. Elle prédit principalement que le long d'un gradient de ressource, la croissance et la biomasse seraient toujours croissantes alors que les processus de différenciation et en particulier le métabolisme secondaire présenteraient une courbe en cloche.

Cette dernière théorie est selon Stamp (2003) la plus aboutie mais toutes auront permis d'apporter un éclairage sur les facteurs influençant l'évolution des composés chimiques de défense chez les plantes : la pression des herbivores, le coût des structures de défense, la disponibilité des ressources, le taux de croissance de la plante, et enfin l'importance comparée de la compétition et de l'herbivorie pour la théorie GDB.

Les pressions évolutives agissent en sélectionnant les compositions chimiques (ou chimiotypes) les mieux adaptées, autrement dit, en sélectionnant les gènes intervenant dans la synthèse des molécules de ces chimiotypes ou leur régulation. Cependant, au sein d'une espèce, à un moment donné, la variabilité phénotypique, et donc celle de la composition chimique, est attribuable non seulement à des différences génétiques entre individus, mais aussi à la variabilité environnementale.



#### 4.1.1.3. Impact des facteurs environnementaux et génétiques sur la variabilité des composés secondaires

L'explication de la variabilité de la composition chimique par des facteurs génétiques et environnementaux a récemment fait l'objet de nombreuses études (Boira et Blanquer, 1998).

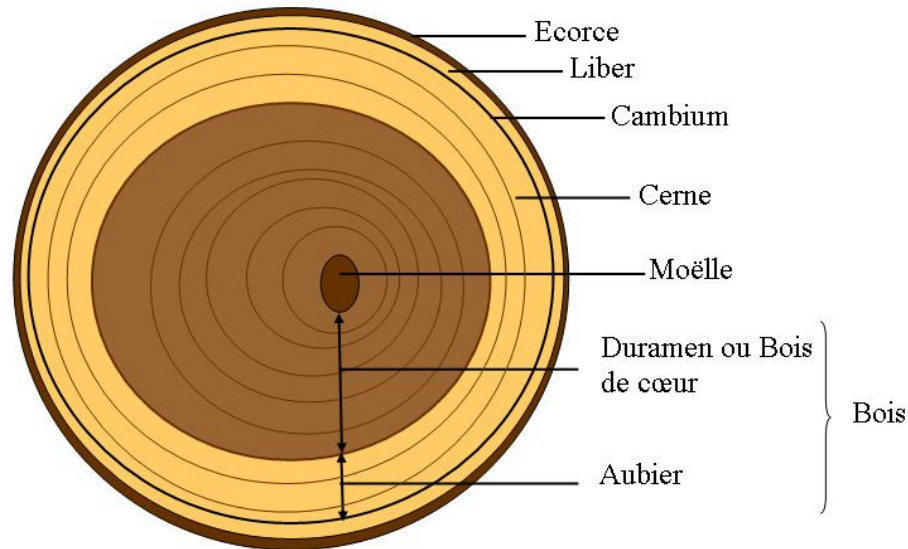
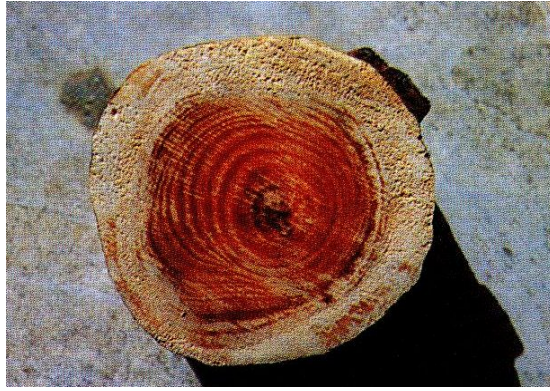
Tout d'abord, chez plusieurs espèces, l'influence du génotype sur la variabilité chimique a été confirmée, par exemple chez *Piper methysticum* (Lebot et Levesque, 1996), *Lupinus argenteus* (Wink et Carey, 1994), ou encore *Melaleuca alternifolia* (Shelton *et al.*, 2002).

Parmi ces études, certaines montrent en outre une variation spatiale dans l'occurrence de différentes formes chimiques, par exemple chez *Trifolium repens* (Daday, 1954a-b), *Mentha citrata* (Murray et Lincoln, 1970), *Origanum vulgare* (Vokou *et al.*, 1993), ainsi que de nombreuses espèces de Thym (Stahl-Biskup, 2002 ; Thompson, 2002). Une telle variabilité spatiale, combinée à une variabilité génétique, constitue un système approprié pour clarifier les impacts respectifs de l'environnement et de la génétique sur la production de composés secondaires. Chez le Romarin *Rosmarinus officinalis*, l'influence de l'environnement est prépondérante, déterminant la variation de plusieurs composés organiques dont les composés secondaires (Malfei *et al.*, 1993). Pour le Thym, de nombreuses études menées sur des espèces de zones froides ont souligné une détermination surtout génétique de la variabilité chimique (Baser *et al.*, 1993 ; Stahl-Biskup, 1984 ; Stahl-Biskup, 1986), toutefois dans des zones plus chaudes comme le bassin méditerranéen, le polymorphisme chimique, beaucoup plus fort, est en grande partie déterminé par les effets abiotiques (Boira et Blanquer, 1998). Par exemple, pour l'espèce *Thymus piperella* L. les compositions chimiques sont corrélées à l'aridité, l'altitude, et la composition organique du sol (Boira et Blanquer, 1998).

Cependant ces facteurs biotiques et abiotiques sont souvent nombreux et difficiles à isoler. Notamment, certaines espèces montrant une corrélation entre variation chimique et facteurs abiotiques tels que la température présentent également une résistance chimique à l'herbivorie, par exemple *Trifolium repens* (Jones, 1973 ; Dirzo et Harper, 1982a, b ; Hughes, 1991), *Lotus corniculatus* (Ellis *et al.*, 1977 ; Compton *et al.*, 1983), et *Thymus vulgaris* (Linhart et Thompson 1995, 1999 ; Amiot, 2005b). Il est alors impossible de savoir si ce sont les facteurs abiotiques ou l'abondance de l'herbivore qui sont à l'origine de la ségrégation spatiale des chimiotypes.

Chez les espèces forestières, les études s'intéressant à la variabilité chimique des composés secondaires suivant la localisation géographique, telles que celles sur *Cedrus Atlantica* (Aberchane, 2004), *Melaleuca Quinquinervia* (Ireland *et al.*, 2002), *Melaleuca ericifolia*





**Figure 4.1:**  
Coupe transversale schématique de bois de Santalum.

**Ecorce (suber):** composée de cellules mortes, elle est imperméable mais permet des échanges gazeux pour la respiration des cellules du cambium et de l'aubier.

**Cambium libéro-ligneux:** c'est une zone de cellules peu différenciées à divisions actives, produisant des cellules qui se différencient en xylème secondaire (le bois, d'où le qualificatif ligneux) et en phloème secondaire (ou liber). C'est uniquement dans cette zone génératrice que se produit la croissance de l'arbre.

**Liber (phloème secondaire):** aussi appelé écorce vivante, possède des cellules qui engendrent vers l'extérieur du liège, et des vaisseaux criblés où circule la sève élaborée.

Ecorce, cambium et liber sont très fin et peu visibles sur la photographie ci dessus.

**Bois (xylème secondaire):**

- **Aubier :** composé de cellules vivantes, actives et à membranes minces ; la sève brute de l'arbre y circule et les matières nutritives s'y accumulent
- **Duramen ou bois de cœur :** Il est constitué de cellules mortes aux membranes épaisses (cellulose, lignine) et dures où les éléments nutritifs ne circulent plus. La conservation du bois est assurée par des gommés, des résines et des tanins qui imprègnent les cellules. Sa dureté assure le port de l'arbre.

**Moelle :** Tissu mou au centre du tronc, se formant au début de la croissance de l'arbre.

**Cernes :** Correspondent aux couches de croissance annuelle. Chez les espèces ligneuses le fonctionnement du cambium suit un cycle (saisonnier dans les climats comportant des saisons bien tranchées) : chaque année, un nouveau cylindre de bois est formé à l'extérieur du précédent. Cependant ces cernes sont très peu visibles chez *S. austrocaledonicum* (Tassin, communication personnelle).

(Brophy, 2004), ou encore *Pinus Halepensis* (Baradat, 1995), n'intègrent généralement pas l'explication génétique du fait de la difficulté de mener des études de croisement en milieu contrôlé. Une étude de la variabilité chimique a en outre été menée sur le Santal des îles Marquises *Santalum insulare* (Butaud *et al.*, 2003 ; Bianchini *et al.*, 2003), démontrant une relative homogénéité de la composition chimique dans l'aire de répartition (à nuancer de par la faiblesse de l'échantillonnage dans de nombreuses îles), sauf pour l'île de Nuku Hiva présentant 2 compositions chimiques distinctes (ou chimiotypes) localisées dans 2 zones géographiques différentes.

Nous allons donc maintenant nous tourner plus précisément vers l'espèce qui nous intéresse : *Santalum austrocaledonicum*.

#### 4.1.2. Les composés secondaires du Santal : localisation et rôle

Les composés secondaires peuvent être présents dans différentes structures de la plante, un exemple en est donné dans le tableau suivant.

organe végétal	exemples d'espèces
Feuilles	Romarin, Sauge
Feuilles de conifères	Sapin, Cèdre, Pin
Tiges	Citronnelle, Lemongrass
Ecorces	Cannelier
Racines	Angélique, Vetiver
Rhizomes	Acorus, Gingembre
Bulbes	Oignon
Bois	Santal, Bois de Rose, Cèdre
Fruits	Bleuet, Citron
Fleurs	Jasmin, Rose
Graines, feuilles	Aneth

Selon les plantes, certains composés secondaires volatils peuvent avoir une odeur particulière et/ou des applications pharmaceutiques intéressantes. Ils sont alors extraits par distillation à la vapeur, l'extrait obtenu étant appelé « huile essentielle ».

Chez le Santal, c'est dans le bois de cœur que les composés secondaires sont présents. Pour rappel les différentes zones pouvant être observées dans une section radiale de tronc d'arbre sont présentées en figure 4.1. La partie centrale de l'arbre est appelée bois de cœur ou duramen, par opposition à la partie périphérique appelée aubier. Le bois de cœur de *Santalum austrocaledonicum* possède une couleur légèrement plus brune que l'aubier, et s'en distingue



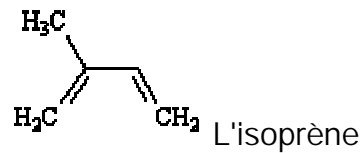
aussi nettement par son odeur caractéristique. L'élaboration du bois de cœur ou duraminisation se déroule dans la zone de transition aubier-bois de cœur (Shankaranarayana, 1987 ; Magel, 2000). Il s'agit d'un processus naturel de vieillissement qui conduit à la mort des cellules de l'aubier interne, à l'hydrolyse des substances de réserve (amidon) et à l'accumulation de substances responsables de sa couleur et de sa durabilité (autrement dit sa résistance). On ne connaît pas précisément le mécanisme responsable de son initiation chez le Santal, mais elle pourrait être due, comme chez le Noyer noir, à une augmentation de la production d'éthylène dans la zone de transition aubier-bois de cœur, principalement durant la dormance (Nelson *et al.*, 1981, dans Grandieu-Burtin, 1999), qui est la période durant laquelle la croissance en diamètre est fortement restreinte (l'hiver sous nos latitudes). Ce pic d'éthylène entraînerait éventuellement, comme chez le Robinier, un renversement des activités métaboliques vers la dégradation des substances stockées (amidon), la synthèse de nouvelles substances responsables de sa couleur et de sa durabilité (composés phénoliques, tanins, etc.), et la mort cellulaire (Magel, 2000).

Les composés secondaires font partie de ces nouvelles molécules apparaissant dans le bois de cœur de Santal. Ces molécules, élaborées au sein du cytoplasme des cellules de la zone de transition aubier/bois de cœur, s'en séparent sous forme de petites gouttelettes qui confluent ensuite en plages plus ou moins étendues. Diverses espèces présentent des bois de cœur riches en composés secondaires, notamment le Bois de Rose d'Amazonie (*Aniba Rosaedora*) et le Cèdre (*Cedrus Atlantica*). Ces composés dans le bois de cœur ont essentiellement un rôle de protection contre les attaques phytophages, et permettent ainsi à l'arbre de conserver intact le bois de cœur qui assure l'essentiel de son soutien. Dans le cas du Santal de Nouvelle-Calédonie, nous avons tenu à vérifier ce rôle de barrière contre les phytophages en engageant des expériences sur les propriétés anti-termite et anti-fongique du bois de cœur (Amusant, 2005, résultats non publiés). La première partie de ces essais, présentés en annexe 2 montre que le bois de cœur brut a un effet toxique sur les termites et les champignons. Afin de savoir quelles substances en particulier repoussent les phytophages, de nouveaux essais ont ensuite été menés avec différents extraits de bois de cœur et ont montré que seule la fraction extraite par le dichlorométhane c'est-à-dire les cires, huiles, alcaloïdes et aglycones, avait un effet toxique sur les termites et les champignons. Une étude similaire avec de l'huile essentielle pure (en cours) semble là encore montrer un effet toxique (Amusant, comm. pers.). On peut vraisemblablement attribuer aux huiles essentielles du Santal calédonien la toxicité vis-à-vis des phytophages, celle-ci ayant déjà été mise en évidence aux travers d'études basées sur d'autres espèces de Santal. Ainsi Chourasia (1978) révèle l'activité inhibitrice de l'huile

## Encadré 4.1 : définition des terpénoïdes

### Les terpénoïdes

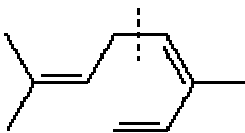
Les terpénoïdes sont des molécules très volatiles fréquentes dans la nature, surtout dans les plantes où ce sont les principaux constituants des huiles essentielles. Les terpénoïdes sont issus du couplage d'au moins 2 sous-unités isopréniques à 5 carbones.



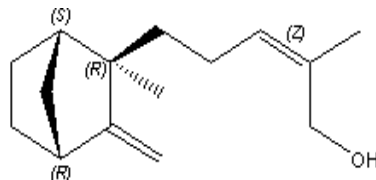
Ou 2-méthylbuta-1,3-diène.

Selon le nombre de ces entités d'isoprène les terpénoïdes sont classés en monoterpénoïdes à 10 carbones, sesquiterpénoïdes à 15 carbones, diterpénoïdes à 20 carbones, etc.

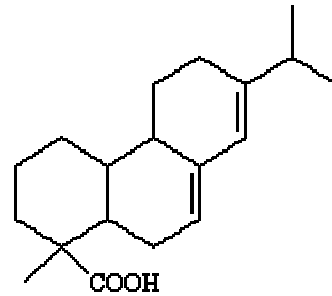
Exemples :



Monoterpénoïde  
ocimène (basilic)



Sesquiterpénoïde  
 $\beta$ -santalol



Diterpénoïde  
acide abiétique (résidu de la distillation de la  
résine de pin en essence de thérébentine)

La plupart des terpénoïdes sont des hydrocarbures mais on trouve aussi des alcools, aldéhydes et cétones.

essentielle contre des souches bactériennes, Shankaranarayana *et al.* (1979) démontrent son activité insecticide sur certaines espèces d'insectes, et Dikshit *et al.* (1984) prouvent une activité pathogène pour les animaux.

Mais que sont précisément les huiles essentielles ? Les huiles essentielles font partie de la famille des métabolites secondaires chez les plantes, listée ci-après.

Les principales familles de métabolites secondaires chez les plantes.

- I. Mucilages (polymères complexes de fucose, d'acide glucorinique et d'acide manuronique)
- II. Gommages et résines (ex : gomme arabique, gomme adragante)
- III. Tannins (polyphénols)
- IV. Hétérosides (ex : hétérosides cyanogènes, lactoniques, ou saponosides)
- V. Huiles essentielles (essences (terpénoïdes) très volatiles, non miscibles à l'eau et souvent parfumées).
- VI. Latex
- VII. Alcaloïdes (ex : quinine, atropine, morphine)
- VIII. Réducteurs de digestibilité (ex : cellulose, lignine, cutines).

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de constituants extraits par distillation à la vapeur d'eau, appartenant de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (voir encadré 4.1 ci-contre) d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane - beaucoup moins fréquents - d'autre part, et que nous ne décrivons donc pas. Les terpénoïdes rencontrés dans les huiles essentielles sont les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire est faible, en d'autres termes les monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes. Les sesquiterpénoïdes représentent à eux seuls plus de  $\frac{3}{4}$  de la composition des huiles (Butaud, comm. pers). Une des dernières théories sur la synthèse des squelettes terpéniques est la voie de l'acide 3R(+)-mévalonique, gouvernée par des enzymes et se déroulant au sein du cytoplasme (Rohmer, 1999 in Rohmer, 2003). La réaction de synthèse est décrite ci-dessous pour un monoterpénoïde.

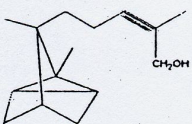


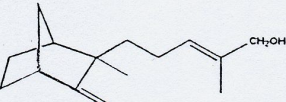
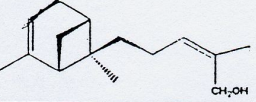
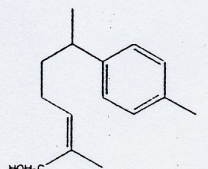
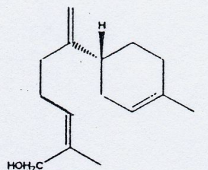
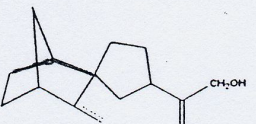


*Acide mévalonique*

Glucose à Acétyl Co-A à Acétylacétyl Co-A + Acétyl Co-A à 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Co-A à **acide mévalonique** à 5-phosphomévalonate à 5 pyrophosphomévalonate à IPP (isopentényl pyrophosphate)(=**isoprène**) + DMAPP (diméthylallyl pyrophosphate) à géranyl pyrophosphate (GPP) à monoterpénoïdes.

**Tableau 4.1**

Les principales molécules à odeur de santal (Alpha, 1997f)

Molécule	Odeur
<p>(+)-<i>cis</i>-<math>\alpha</math>-santalol</p> 	<p>plutôt faible légèrement boisée réminiscence de l'<math>\alpha</math>-cédrène</p>
<p>(-)-<i>cis</i>-<math>\beta</math>-santalol</p> 	<p>très forte boisée avec une note animale (odeur caractéristique de santal)</p>
<p>(+)-<i>épi</i>-<i>cis</i>-<math>\beta</math>-santalol</p> 	<p>faiblement boisée</p>
<p>(-)-<i>trans</i>-<math>\beta</math>-santalol</p> 	<p>moyennement forte boisée</p>
<p>(-)-(<i>Z</i>)-<math>\alpha</math>-<i>trans</i>-bergamotol</p> 	<p>légère assez boisée réminiscence de citron</p>
<p>(<i>Z</i>)-nuciférol</p> 	<p>faiblement boisée</p>
<p>(<i>Z</i>)-lancéol</p> 	<p>faiblement boisée</p>
<p>spirosantalol</p> 	<p>faiblement boisée</p>



Les molécules caractéristiques de l'odeur du Santal sont listées dans le tableau 4.1. Ces molécules sont dérivées de 3 squelettes sesquiterpéniques : le santalane (ex :  $\alpha$ -santalol,  $\beta$ -santalol), le bisabolane (nuciférol, lancéol) et le bergamotane (bergamotol). Ces 3 squelettes sont issus de 3 voies de biosynthèse partant d'un précurseur identique mais dont les étapes sont régies par des enzymes distinctes (figure 4.2).

Nous venons de voir comment se formaient les composés secondaires odorants du bois de cœur de Santal, ainsi que leur rôle écologique. A présent nous allons nous intéresser à la composition chimique des huiles essentielles.

L'huile essentielle de Santal a jusqu'alors été principalement étudiée de manière qualitative. Les premières études sur sa composition démarrent au début du XX<sup>ème</sup> siècle, sur l'espèce la plus exploitée, le Santal d'Inde *Santalum album*. En 1910, Semmler et ses collaborateurs (Semmler *et al.*, 1910, cité dans Alpha, 1997) avaient identifié approximativement la composition de l'essence : 10% d'hydrocarbures ( $\alpha$  et  $\beta$ -santalènes), 90% de santalols ( $\alpha$  et  $\beta$ -santalols). Par la suite, d'autres composés ont été caractérisés, et à la fin du siècle, plus d'une centaine de molécules avaient été identifiées sur *Santalum album* (Adams *et al.*, 1975 ; Demole *et al.*, 1976 ; Zundel, 1976 ; Christenson *et al.*, 1981 ; Ranibai *et al.*, 1986 ; Nikiforov *et al.*, 1990, références citées dans Alpha, 1997). D'autres espèces de Santal ont aussi été étudiées pour la composition chimique de leur huile essentielle, *Santalum insulare* de Polynésie française (Vahirua-Lechat, 1994, citée dans Alpha, 1997 ; Butaud *et al.*, 2003), *Santalum yasi* des Fidji (Smith *et al.*, 1979), *Santalum spicatum* en Australie, et *Santalum lanceolatum* du Queensland d'Australie où a été isolé pour la première fois le lancéol (Hallé, 1972) dont nous allons reparler dans notre étude.

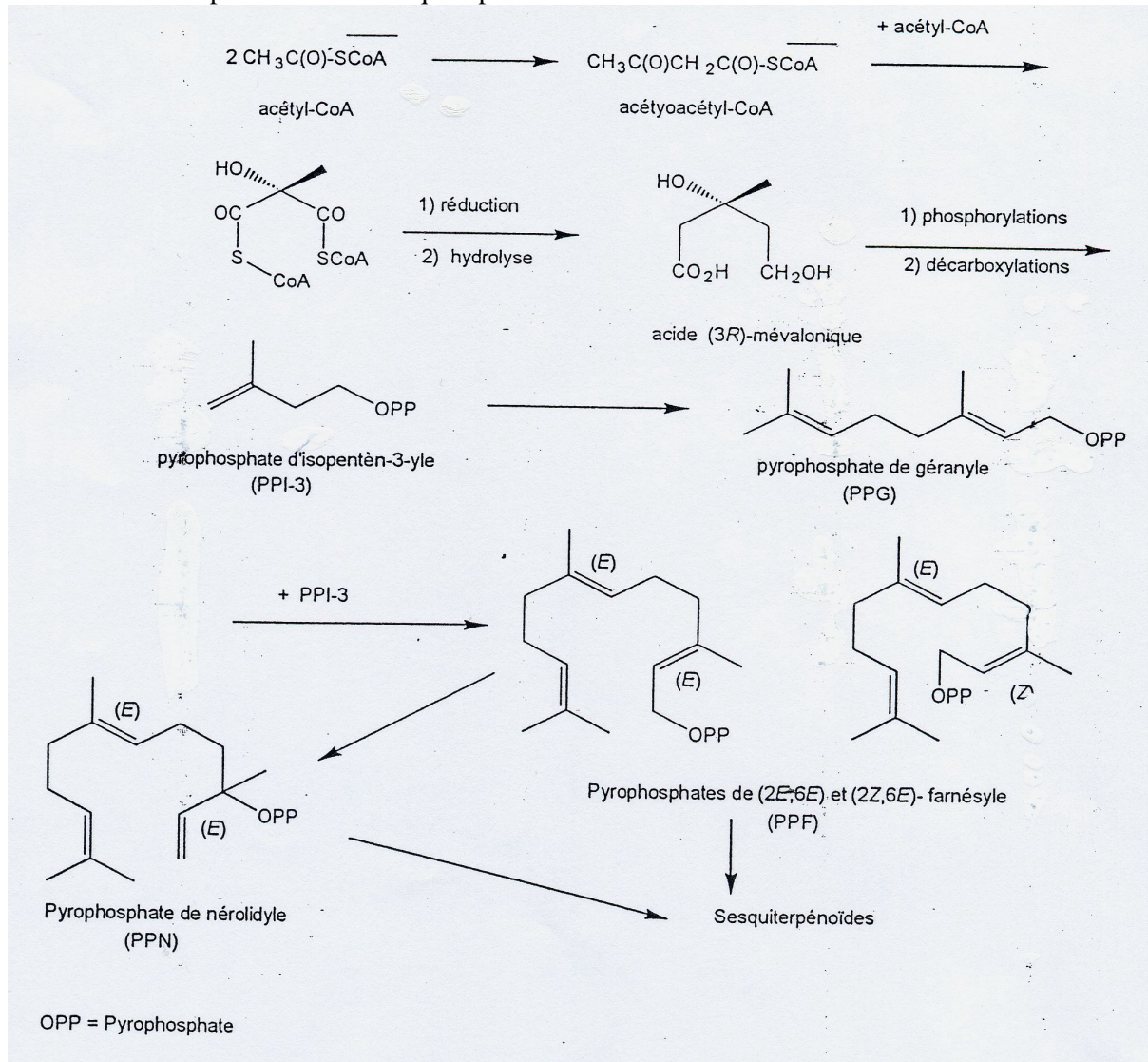
Des études ont été conduites sur le lien entre les molécules présentes dans l'huile essentielle de Santal et l'odeur caractéristique de Santal. Il en résulte que les composés les plus odorants sont les composés majoritaires : l' $\alpha$  et le  $\beta$ -santalol (Müller, 1991).

Concernant *Santalum austrocaledonicum* plus particulièrement, la seule étude chimique jusqu'alors est celle des composés volatils de la concrète menée par Alpha en 1997 (Alpha, 1997, Alpha *et al.*, 1997 a-b-c). La concrète est, comme l'huile essentielle, un produit de l'extraction des molécules volatiles du bois de cœur. Leur différence chimique vient de leur mode d'extraction : l'huile essentielle est issue d'une hydrodistillation, et la concrète d'une extraction au solvant (ici le chloroforme  $\text{CHCl}_3$ ). Il en résulte que la concrète contient les mêmes molécules volatiles que l'huile essentielle, plus d'autres molécules qui ne peuvent pas être entraînées par l'hydrodistillation (essentiellement des diols). L'étude de la composition



**Figure 4.2**

**A/ Formation des précurseurs de sesquiterpénoïdes**



chimique des éléments volatils de la concrète apporte donc plus de renseignements que celle des huiles essentielles seules car elle permet de caractériser non seulement les composés présents dans l'huile essentielle, mais aussi ceux présents dans la fraction lourde de la concrète : les diols.

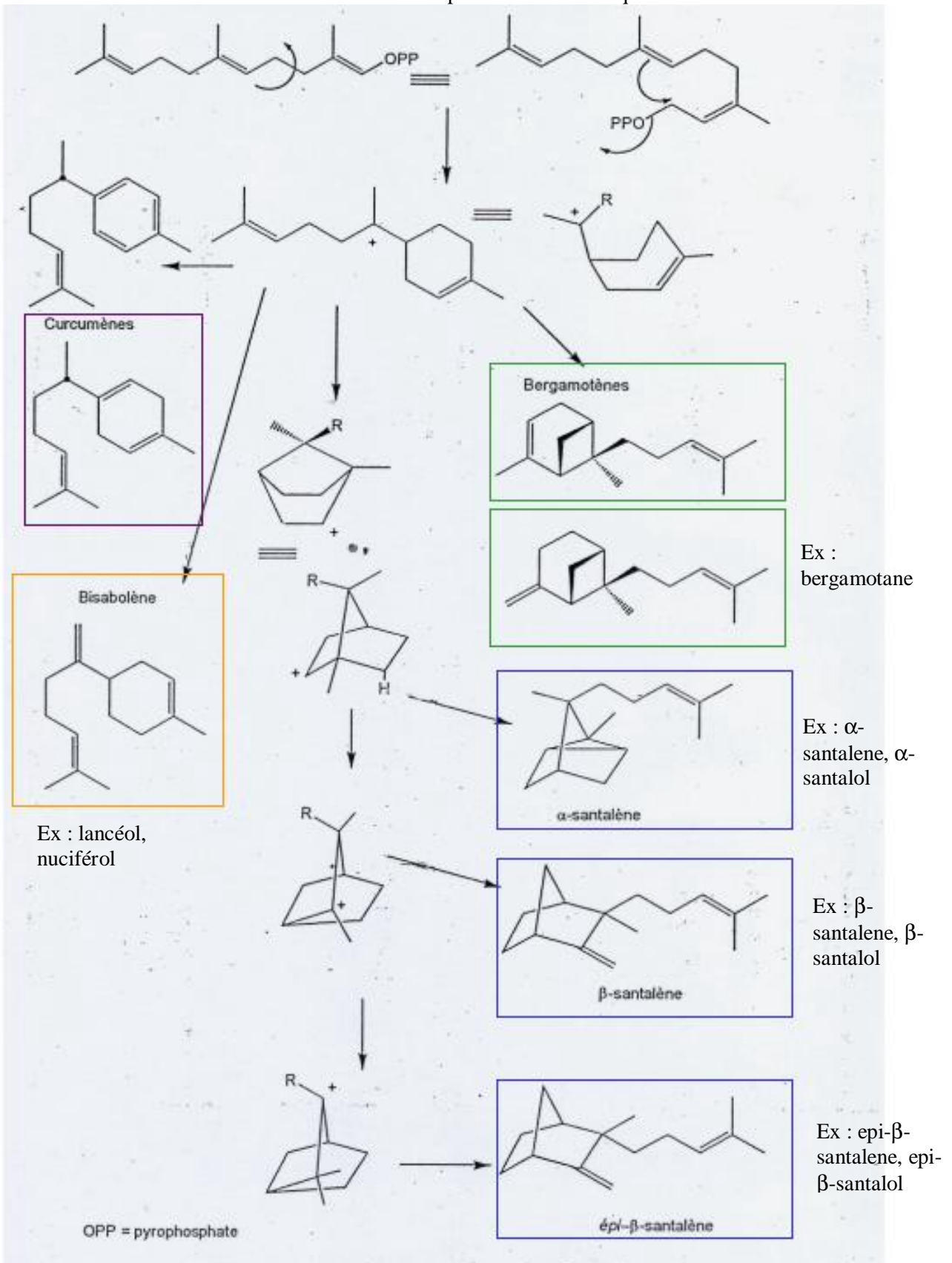
Cependant, l'étude d'Alpha, comme les études des autres espèces de Santal, ne portaient que sur un nombre très réduit d'échantillons (4 à Maré, 2 à l'île des Pins). Les résultats montraient que les bois de Maré avaient une forte teneur en (E)-lancéol alors que ceux de l'île des Pins avaient des teneurs plus élevées en  $\beta$ -santalol, en (Z)- $\alpha$ -trans-bergamotol et en nuciférol.

#### **4.1.3. Objectifs de l'étude**

Nous possédons donc peu de connaissances sur la variabilité chimique du Santal de Nouvelle-Calédonie. Notre étude a donc pour objectif de compléter l'étude d'Alpha avec un échantillonnage plus consistant, et de caractériser les déterminants de cette variabilité.

L'étude qui va suivre est basée sur un échantillonnage important au sein de l'aire naturelle de *Santalum austrocaledonicum* dans l'archipel de Nouvelle-Calédonie. La concrète présentant une méthode d'extraction mieux adaptée à l'analyse de nombreux petits échantillons que l'huile essentielle, c'est sur la partie volatile de la concrète que nous avons travaillé. Cette étude a deux objectifs : 1) évaluer la variation intra et inter-population des composés de la concrète, 2) analyser les déterminants de cette variation : les déterminants abiotiques par une analyse de la relation avec les paramètres climatiques et édaphiques, et les déterminants génétiques avec une approche par les marqueurs moléculaires microsatellites nucléaires.

B/ Formation des squelettes sesquiterpéniques. Les 4 squelettes principaux sont encadrés de couleurs différentes. La concrète de Santal étudiée ne contenait pas de molécule à squelette Curcumène.



## **4.2. Echantillonnage de bois de cœur, analyses chimiques et statistiques**

### **4.2.1. Echantillonnage**

#### **4.2.1.1. plan d'échantillonnage**

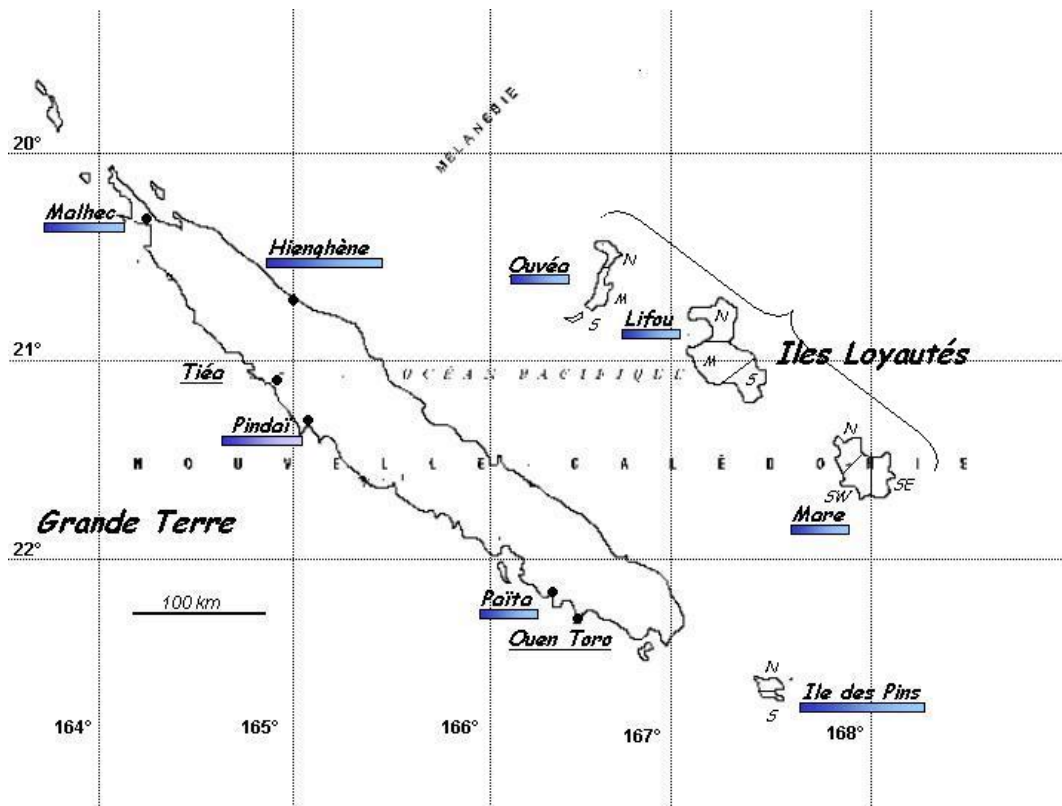
217 individus ont été récoltés sur l'ensemble de l'archipel néo-calédonien, c'est-à-dire les 3 îles Loyauté (Ouvéa, Lifou, Maré), l'île des Pins, et la Grande Terre (figure 4.3 et tableau 4.2), du 22 septembre au 21 octobre 2003. En revanche, compte tenu de la superficie de Grande Terre (16 350 km<sup>2</sup>) et de l'état relictuel des populations s'y trouvant, l'échantillonnage a été effectué dans des populations bien distinctes : Païta au Sud-Ouest, Pindaï au Centre-Ouest, Malhec au Nord-Ouest et Hienghène au Nord-Est. Trente individus ont été récoltés dans chaque localité, excepté à Pindaï où seuls 7 individus ont été trouvés.

#### **4.2.1.2. méthode de recueil des échantillons**

Les critères de choix des arbres échantillonnés étaient en premier lieu l'éloignement entre individus récoltés (idéalement plus de 30m) afin d'éviter de prélever sur un individu issu de drageonnage en même temps que sur son clone, car tous deux sont susceptibles d'avoir des compositions chimiques fortement corrélées. La seconde priorité était de récolter des arbres de gros diamètre, en général > 25 cm. En effet, des études antérieures, menées sur d'autres espèces de Santal (indien et australien), ont montré que le diamètre, représentatif de l'âge d'un arbre, influençait la teneur en huile du bois de cœur (Jain *et al.*, 1998), et qu'au-delà d'une circonférence de 80 cm (soit un diamètre près de 25 cm), la teneur en huile était constante (Jain *et al.*, 2003). Le diamètre étant fortement corrélé à l'âge de l'arbre et donc à sa teneur en bois de cœur, ce critère permettait d'homogénéiser la récolte. Nous avons aussi cherché des arbres poussant sur un substrat non sablonneux, ce dernier étant réputé donner au bois de cœur des arbres une odeur différente. La composition chimique du bois de cœur variant considérablement selon la localisation dans l'arbre (Moretta, 2001), nous avons fait en sorte de récolter les échantillons de bois de cœur à hauteur constante de 50 cm au-dessus du collet.

Les copeaux de bois de cœur ont été prélevés à l'aide d'une perceuse électrique à batterie munie d'une mèche à bois de diamètre 10 mm. L'odeur et la couleur caractéristique du bois de cœur permettaient de les distinguer clairement de l'aubier. En moyenne 5 grammes de copeaux ont été récoltés sur chaque individu. Les trous laissés par la perceuse dans le tronc ont été colmatés au mastic afin d'éviter toute contamination de la blessure.

**Figure 4.3**  
Localisation des populations échantillonnées



**Tableau 4.2**  
Caractéristiques des populations échantillonnées (nombre d'individus échantillonnées, surface, localisation, pluviométrie, type de sol).

Population	N. ind analysés (N. ind récoltés)	surface de récolte <sup>(1)</sup> [taille de l'île] (km <sup>2</sup> )	Latitude	Longitude	Pluviométrie moyenne (mm)	Type de sol
Pindai	7 (7)	3.43	21°31'	164°96	894	alluvions
Malhec	20 (30)	0.87	20°19'	164°10	1202	sols fersiallitiques
Païta	20 (30)	0.67	22°09'	166°22	1165	grès
Hienghène	20 (30)	0.57	20°43'	164°55	2245	grès, schistes
total Grande Terre	67 (97)	5.79 [16 350]				
Ile des Pins	20 (30)	57.51 [152]	22°37'	167°28	1475	sable corralien
Lifou	20 (30)	644.04 [1196]	20°58'	167°04	1802	calcaire
Mare	20 (30)	333.41 [650]	21°35'	167°53	1468	calcaire
Ouvéa	30 (30)	87.85 [132]	20°38'	166°34	1442	calcaire
Total	157 (217)	1128.6 [18480]				

(1) surface correspondant au périmètre de la population de santal

Chaque échantillon de copeaux a été placé dans une boîte hermétique à l'abri de la lumière afin de limiter la dégradation des composés du bois de cœur et l'évaporation des produits volatils. Pour chaque arbre prélevé, plusieurs caractéristiques ont été relevées : localisation, position GPS, taille et diamètre, et plusieurs feuilles ont été récoltées afin de procéder à des analyses génétiques au CIRAD, à Montpellier.

L'ensemble des analyses chimiques du bois de cœur décrites ci-dessous a été mené par le laboratoire Cosmécal en Nouvelle-Calédonie (Camille Isnard et Colin Godefroy) en se basant sur l'étude de *S. insulare* par l'Université de Polynésie Française (UPF) (Bianchini *et al.*, 2003).

#### **4.2.2. Analyses chimiques du bois de cœur**

Pour rester dans la limite des moyens financiers disponibles, seuls 157 échantillons parmi les 217 récoltés ont été analysés chimiquement. Le choix de ces échantillons a été réalisé de sorte à avoir un nombre équivalent d'individus dans chaque population (soit 20 individus par population, excepté 30 à Ouvéa et 7 à Pindai), en privilégiant les échantillons issus d'arbres dont le diamètre était le plus proche possible de la moyenne, afin d'éviter au maximum l'effet « âge de l'arbre » sur la variabilité des compositions chimiques.

##### **4.2.2.1. Extraction des échantillons**

La méthode d'extraction des échantillons a été l'extraction au solvant car elle se prête mieux à l'analyse de nombreux petits échantillons que l'entraînement à la vapeur qui nécessite en moyenne 10 fois plus de copeaux. C'est donc la concrète qui a été extraite.

Une fois bien homogénéisé par mélange manuel, 1 gramme de copeaux est pesé à l'aide d'une balance de précision, puis placé dans un flacon de 15 mL avec 10 mL de solvant : le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>). Enfin, 1 mL d'une solution étalon (octanol en solution dans de l'éthanol à 2 g/L) est introduit dans le flacon afin de pouvoir estimer le rendement de l'extraction et donc celui du bois prélevé. L'extraction a été fixée à 48 heures pour chaque échantillon afin que toute la concrète soit mobilisée. Préalablement à l'injection dans le chromatographe, les échantillons ont été filtrés sur filtre papier. Ils ont enfin été dilués 3 fois dans du chloroforme dans un flacon de chromatographie d'un volume de 1 mL afin d'avoir la concentration idéale pour une meilleure détection et intégration par le chromatographe.



#### 4.2.2.2. Injection et analyse des échantillons

L'analyse des échantillons a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Perkin Elmer AutoSystem XL, équipé d'un injecteur automatique Autosampler A/S Perkin Elmer utilisant une seringue de 5 $\mu$ L, lavée avant l'injection au solvant puis à la solution analysée et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) à H<sub>2</sub> (45 mL/min) et air (450 mL/min) et d'une valve PSI, split. La colonne utilisée est une PE-5 N9931 6079 (5 % diphényl, 95 % diméthyl polysiloxane) de 60 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et de 0,25  $\mu$ m d'épaisseur du film de phase. Le gaz vecteur a été l'Hélium à un flux de 12 mL/min et le volume injecté de 1  $\mu$ l par échantillon. Le logiciel qui pilote le système est Turbochrom 4.1 (Perkin Elmer).

Le programme du chromatographe appliqué à tous les échantillons a été le suivant :

- température initiale de 80°C,
- température finale de 245°C, et
- gradient de température de 3°C/min.

Chaque analyse a donc duré près de 55 minutes. La température de l'injecteur et du détecteur a, par ailleurs, été fixée à 280°C.

La validité de chaque analyse a été vérifiée par l'observation de chaque chromatogramme. En effet, dans le cas d'extraits trop ou pas assez concentrés, la séparation des pics par le chromatographe n'est pas la même, rendant leurs comparaisons statistiques moins précises. Le cas échéant, l'extrait a été à nouveau dilué ou concentré afin d'être de nouveau analysé. En général, la bonne concentration des extraits est telle que la somme des surfaces intégrées est comprise entre  $1.10^6$  et  $1,5.10^6$  (unités du logiciel).

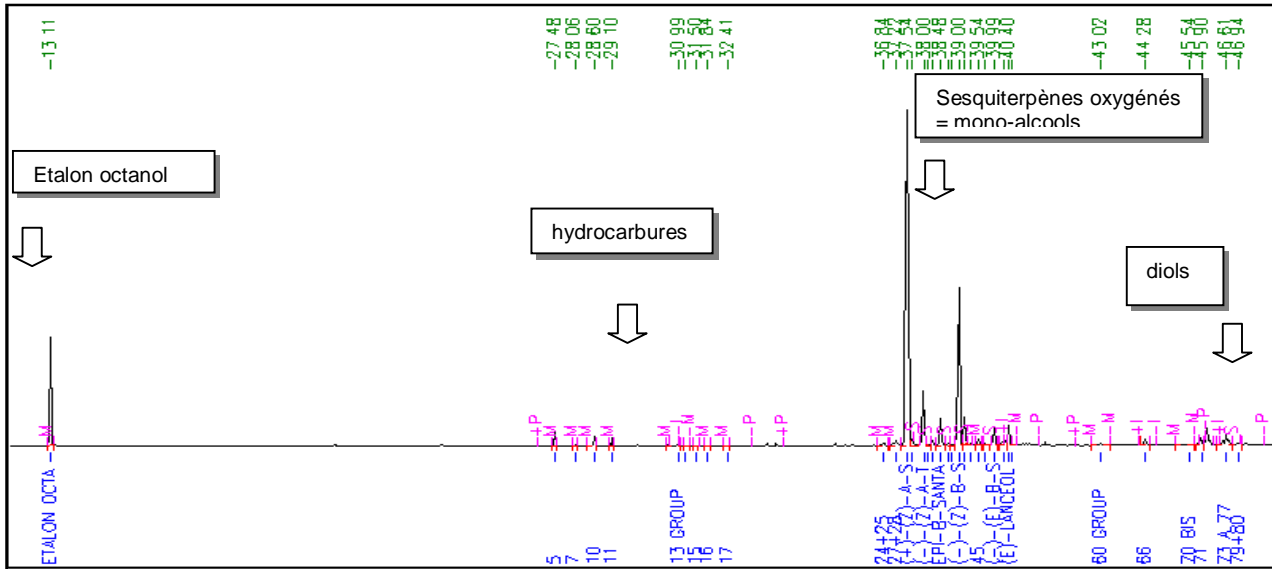
#### 4.2.2.3. Interprétation des chromatogrammes.

La sélection des pics les plus pertinents, les séparations et regroupements ont été établis sur une base essentiellement quantitative : lorsque plusieurs pics, correspondant à plusieurs molécules se superposent, ils sont regroupés sous une même dénomination, d'autre part, on élimine les molécules trop faibles ou insuffisamment concentrées. Dans notre analyse, 33 pics ou groupes de pics bien distincts et facilement repérables ont ainsi été retenus. On opère pour chaque fichier de données une intégration de l'ensemble des pics y compris celui de l'étalon n-octanol afin d'obtenir l'aire de ce dernier, qui servira au calcul des rendements, et une intégration sans l'étalon pour avoir l'aire totale de la concrète et les compositions relatives réelles. L'intégration des pics de chacune des 150 analyses a été contrôlée et validée. La



**Figure 4.4**

Exemple de chromatogramme obtenu lors des analyses (échantillon LIFOU 13)



répétitivité des temps de rétention est bonne. Des tests de répétitivité n'ont pu être menés sur nos échantillons du fait du fort coût unitaire de ce type d'analyse.

Les premiers pics à apparaître sont ceux correspondant aux molécules les plus volatiles. Les derniers concernent les molécules les moins volatiles sachant que certaines trop peu volatiles n'apparaissent pas sur le chromatogramme bien qu'elles soient présentes dans la concrète. Pour résumer, apparaissent donc tout d'abord les hydrocarbures qui sont suivis des monoalcools (ou sesquiterpénols oxygénés) puis des diols (figure 4.4). Les noms précis des molécules ont pu être déterminés pour 10 pics sur les 33 sélectionnés. Cette identification a été effectuée grâce au calcul des indices de Kovats (temps de rétention) et en s'appuyant sur les résultats d'études précédentes en Chromatographie Gazeuse et Spectrométrie de Masse (Phytochemical Services Australia pour Cosmécil). Ces 10 molécules sont des molécules importantes, communes dans les compositions chimiques des huiles essentielles de Santal.

#### 4.2.2.4. Les variables analysées

L'intégration des pics pour chaque chromatogramme permet d'obtenir les aires des pics ( $A_p$ ) (proportionnelles à la quantité de molécules dans la concrète), l'aire de l'étalon n-octanol ( $A_e$ ), ainsi que l'aire totale de la concrète ( $A_c$ ) qui est la somme des aires de chaque pic (aire de l'étalon comprise).

Le pourcentage d'un pic dans un chromatogramme ( $P_p$ ) est défini comme suit :

$$P_p = \left( \frac{A_p}{A_c} \right) \times 100$$

Ces pourcentages sont souvent préférés aux aires des pics pour mener des analyses statistiques (Buttaud, comm.pers.). Nous avons donc choisi de mener toutes les analyses statistiques de ce chapitre sur les pourcentages d'aires des pics.

Le rendement de la concrète se calcule de la manière suivante :  $R = \left( \frac{Me \times Ac}{Mb \times Ae} \right)$ ,

où  $Me$  est la masse de l'étalon (masse standard de 0.182  $\mu\text{g}$  par échantillon) et  $Mb$  la masse de bois (masse de l'échantillon), qui est précisément de 1g pour chaque échantillon.  $R$  s'exprime donc en g par kg de bois. Cependant nous n'avons pas analysé les rendements car la masse de l'échantillon peut être influencée par divers facteurs indépendants de l'arbre, dont le taux d'humidité ambiant lors de la récolte. Ces facteurs peuvent conduire à des interprétations erronées du rendement de la concrète.

Dans le but d'étudier les origines possibles de la variation chimique, nous avons inclus à cette étude d'autres types de données :



- le diamètre à 1.30 m et la hauteur de chaque arbre prélevé
- des facteurs abiotiques : la pluviométrie moyenne au sein des populations échantillonnées, ainsi que le type de sol.
- les données des microsattellites nucléaires pour chaque arbre prélevé.

### **4.2.3. Méthode d'analyse statistique**

#### **4.2.3.1. Description de la variabilité sur l'ensemble de la Nouvelle-Calédonie**

L'ensemble de l'analyse des données a été effectué avec les logiciels Xlstat 7.5 (Addinsoft, 2005) et SAS (1990). En premier lieu nous avons procédé à l'analyse des statistiques élémentaires : moyenne, écart-type, coefficient de variation, maximum et minimum des pourcentages des aires des pics pour l'ensemble des 33 pics, diamètre et hauteur, sur l'ensemble des populations. Pour chaque variable, la distribution a été représentée sous forme d'un histogramme de fréquences.

Afin de voir si certains pics étaient corrélés, nous avons réalisé une matrice de corrélation entre les 33 pics. Nous avons aussi testé (test de Pearson) les corrélations linéaires entre diamètre, hauteur, pluviométrie, et toutes les autres variables.

#### **4.2.3.2. Variation inter-population par approche multivariée (ACP et AFD)**

Dans un premier temps, notre étude portant sur 157 individus et 33 pics, nous avons cherché à obtenir un résumé pertinent des données initiales, c'est-à-dire pouvoir les représenter dans un espace de dimension réduite en déformant le moins possible la réalité. Ceci a été réalisé en procédant à une Analyse en Composantes Principales (ACP).

Nous avons ensuite cherché à savoir si la variabilité chimique était structurée selon les populations. Pour cela nous avons testé si les 33 pics permettaient d'identifier et de différencier les populations, ce qui fut accompli au moyen d'une Analyse Factorielle Discriminante (AFD). L'AFD a aussi été menée en regroupant les populations par provenance : Grande Terre, île des Pins et îles Loyauté, de manière à voir s'il existait une structuration selon ces plus vastes zones géographique.

Nous avons aussi cherché à savoir si les résultats pouvaient dépendre de la fonction des molécules analysées (hydrocarbures, mono-alcools, diols). Nous avons donc mené séparément les analyses pour ces 3 catégories de molécules, pour voir les pics analysés dans chaque



groupe, puis nous avons comparé visuellement les résultats à ceux obtenus pour l'ensemble des pics.

#### **4.2.3.3. Analyse de variance à effets fixes et comparaison de moyennes pour les molécules principales**

Nous nous sommes intéressés plus précisément aux 4 molécules principales : (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol, (-)-(Z)- $\alpha$ -trans-bergamotol, (-)-(Z)- $\beta$ -santalol, et (E)-lanceol, auxquelles nous avons joint le (Z)-nuciférol qui avait permis d'identifier des chimiotypes chez le Santal de Polynésie française (Butaud, 2003). Pour chacune de ces molécules nous avons calculé leur moyenne et leur coefficient de variation pour chaque population, et comparé les moyennes entre populations en effectuant un test de Bonferroni entre chaque couple de populations. Pour chaque molécule plusieurs groupes ont ainsi pu être définis, chacun regroupant les populations de moyennes non significativement différentes.

#### **4.2.3.4. Variation inter et intra-population par modèle à effets aléatoires**

Nous avons cherché à savoir comment se structurait la variabilité de la composition chimique de la partie volatile de la concrète entre populations et à l'intérieur des populations. A cette fin nous avons cherché à obtenir les matrices de variance/covariance entre pics entre populations en utilisant le Modèle Linéaire Généralisé qui se présente comme tel :

$$Y_{ij} = \mu + P_i + R_{ij},$$

où  $Y_{ij}$  représente la valeur du caractère pour l'individu  $j$  dans la population  $i$ ,  $\mu$  est la moyenne générale du caractère,  $P_i$  est l'effet de la population  $i$ ,  $R_{ij}$  l'effet de l'individu  $i$  dans la population  $j$ .

Dans ce modèle nous avons considéré l'effet « population » comme aléatoire suivant une loi Normale de variance  $\sigma_p^2$  et de moyenne nulle. L'effet résiduel est aussi considéré aléatoire et correspond à la variation intra-population de variance  $\sigma_w^2$  et de moyenne nulle. Nous avons défini la part de variation intra-population par rapport à la variance totale par

$$R = \sigma_p^2 / (\sigma_p^2 + \sigma_w^2),$$

ceci pour chaque molécule.

#### **4.2.3.5. Variation intra-population : approche multivariée**

Afin de voir s'il existe une structuration spatiale de la variabilité à l'intérieur des populations, nous avons conduit une Analyse en Composantes Principales (ACP) pour chacune des 8



populations étudiées, exceptée Pindaï pour laquelle le nombre d'individus était trop faible. Chaque population a été subdivisée en 2 ou 3 sous-populations basées sur les coordonnées géographiques des individus. Les individus des différentes sous-populations ont été identifiés sur le graphe de l'ACP par des couleurs différentes. Compte tenu du faible nombre d'individus par sous-population, nous n'avons pas conduit d'AFD, car leurs résultats n'auraient pas été pertinents.

#### **4.2.3.6. Analyse de différents facteurs explicatifs de la variabilité**

##### **4.2.3.6.1. Hauteur et diamètre des arbres.**

Nous avons voulu vérifier que la composition chimique, autrement dit l'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse chimique, était indépendante de la taille des arbres. Bien que les récoltes aient été conduites de manière à obtenir un échantillon homogène au niveau de la hauteur et du diamètre, il subsiste une petite variabilité entre les arbres récoltés, que nous avons tenté d'exploiter pour voir si elle pouvait constituer un facteur explicatif de la variabilité de la composition chimique. Nous avons donc mené un test de corrélation de Pearson entre les aires des pics et les variables hauteur et diamètre de l'arbre au niveau des moyennes par population.

##### **4.2.3.6.2. Facteurs abiotiques.**

De nombreuses études rapportent une influence des paramètres abiotiques sur la variabilité chimique (voir IV.1.). Ces facteurs, notamment la pluviométrie très variable entre populations, pourraient influencer la composition chimique du bois de Santal. Nous avons donc là encore mené un test de Pearson entre les aires des pics moyennes par population et la pluviométrie moyenne par population.

Pour étudier l'effet du type de sol, nous avons réalisé une Analyse de Variance (ANOVA) en prenant chaque type de sol comme étant une variable qualitative.

Afin de visualiser le lien entre ces variables abiotiques et les molécules identifiées de la concrète, nous avons aussi mené une ACP sur ces molécules en utilisant leur moyenne par population, puis nous avons ajouté en variables supplémentaires la pluviométrie, la température, le type de sol, et le nombre de mois secs.

La température annuelle n'a pas été retenue pour cette étude car sa variation inter-population est très faible (cf chapitre 1).





#### 4.2.3.6.3. Analyse combinée des marqueurs chimiques et des marqueurs microsatellites

Ne disposant ni des gènes codant pour les molécules de la concrète, ni même d'essai contrôlé permettant de connaître la variation des caractères d'une génération à l'autre, nous ne pouvions pas maîtriser la composante génétique de la variabilité chimique.

En revanche, nous disposions d'une étude sur des marqueurs neutres, c'est-à-dire non soumis à la sélection. Il nous a donc semblé intéressant de vérifier l'hypothèse que les gènes codant les molécules des huiles essentielles étaient soumis à la sélection, c'est-à-dire ne suivaient pas le même processus de dérive que les microsatellites nucléaires. Pour cela nous avons comparé la structuration des individus sur une base chimique avec celle obtenue sur la base des microsatellites. Pour cette étude, nous avons fait l'hypothèse que les microsatellites étudiés n'étaient pas liés à des gènes soumis à sélection.

Cette comparaison a été explorée par le biais de différentes méthodes. Pour ces diverses approches, nous avons conservé les molécules ayant une proportion moyenne dans la concrète supérieure à 1%, leurs valeurs étant plus fiables que celles des molécules en quantité infime. Nous avons utilisé les mêmes individus pour l'approche génétique et chimique, c'est-à-dire les 157 individus analysés par ces deux méthodes.

- La première méthode de comparaison consiste à comparer les arbres de distances. Nous avons obtenu l'arbre des distances chimiques entre populations avec le logiciel DARWIN 5 (Perrier, 2003), en utilisant comme distance entre populations la distance Euclidienne usuelle et en réalisant 1000 bootstraps. L'arbre des distances génétiques a quant à lui été réalisé avec PHYLIP 3.6. (Felsenstein, 1993), logiciel d'analyse de données moléculaires. Les distances génétiques entre paires d'îles et/ou de populations ont été estimées à l'aide de la formule de Cavalli-Sforza (1967) adaptée à la description de la structuration des populations en considérant leur histoire évolutive, et notamment les effets de dérive.

La matrice de distances a été obtenue à partir du programme GENDIST de PHYLIP (PHYLIP, version 3.6, Felsenstein, 1993) et a permis, à l'aide du programme NEIGHBOR (PHYLIP) de construire un arbre de distances de type Neighbor-Joining, suivant la méthode de Saitou & Nei (1987). La robustesse des nœuds a été évaluée par 1000 bootstraps à l'aide du programme SEQBOOT (PHYLIP), et l'arbre consensus obtenu par le programme CONSENSE (PHYLIP) a été dessiné à l'aide du logiciel TREEVIEW (Page, 1996).

- La seconde est la comparaison statistique des matrices de distances grâce au test de Mantel (1967) utilisant le coefficient de corrélation de Pearson. Nous avons comparé ces matrices pour l'ensemble des individus, puis entre individus d'une même population et enfin

**Tableau 4.3**

Récapitulatif des différents pics : fonction (si connue), pourcentage de l'aire totale, écart type, Coefficient de variation (CV), valeurs maximum et minimum de ce pourcentage d'aire totale, sur l'ensemble des individus échantillonnés. Les 4 molécules d'aires les plus importantes sont soulignées.  
groupe 13 \*: groupe de plusieurs molécules autour du pic 13.

Fonction	Pic	Aire [%]	Ecart type	CV (écart-type/moyenne)	Min	Max
<b>Hydrocarbures</b>	(Z)- $\alpha$ -santalene (5)	0.84	0.43	0.51	0.07	2.84
	7	0.13	0.07	0.57	0.01	0.53
	Epi- $\beta$ -santalene (10)	0.72	0.32	0.44	0.12	2.04
	(Z)- $\beta$ -santalene (11)	0.68	0.4	0.58	0	3.04
	groupe 13 *	1.07	1.23	1.15	0.03	11.02
	14	0.12	0.27	2.22	0	2.75
<b>non déterminé</b>	15	0.12	0.27	2.33	0.01	2.45
	16	0.1	0.25	2.43	0	1.84
	17	0.17	0.33	1.93	0	2.17
<b>mono-alcools</b>	24+25	0.63	0.57	0.9	0.1	6.25
	26 a 28	0.75	0.34	0.46	0.06	2.96
	<u>(+)-(Z)-<math>\alpha</math>-santalol (30)</u>	39.36	11.2	0.28	2.77	53.34
	32	1.32	0.97	0.73	0.16	5.45
	<u>(-)-(Z)-<math>\alpha</math>-trans-bergamotol (34)</u>	7.25	2.24	0.31	1.07	11.36
	35	0.19	0.48	2.5	0.01	5.72
	36	0.46	0.22	0.48	0.07	1.62
	Epi- $\beta$ -santalol (37)	2.86	0.86	0.3	0.11	4.35
	38	0.34	0.26	0.77	0.12	2.42
	39	0.47	0.96	2.04	0.01	8.95
	<u>(-)-(Z)-<math>\beta</math>-santalol (40)</u>	16.42	5.23	0.32	0.45	24.28
	(Z)-nuciferol (41)	1.47	1.25	0.85	0.15	8.28
	44	0.2	0.13	0.62	0.02	0.89
	45	0.68	0.57	0.83	0.08	4.42
	46	0.52	0.45	0.86	0.1	4.72
	(-)-(E)- $\beta$ -santalol (47)	1.23	0.79	0.65	0.24	6.64
	48+49	0.95	0.96	1.01	0.11	9.29
<u>(E)-lanceol (50)</u>	13.66	16.61	1.22	0.12	80.83	
51	0.2	0.26	1.28	0.01	2.78	
<b>non déterminé</b>	63	0.42	1.09	2.6	0.02	11.84
	64 a 69	1.35	1.43	1.06	0.18	11.02
<b>Diols</b>	71	0.37	0.87	2.36	0	8.22
	73 a 77	1.71	1.3	0.76	0.18	10.12
	79 + 80	1.46	0.52	0.36	0.05	3.36
	Moyenne	2.98	1.61	1.08	0.19	9.63

entre populations. La distance chimique utilisée était à nouveau la distance Euclidienne, et la distance génétique était le simple matching, calculée avec DARWIN 5 :  $d_{ij} = \frac{u}{m+u}$ , où  $d_{ij}$  est la distance entre les unités  $i$  et  $j$ ,  $u$  le nombre d'allèles non partagés au même locus,  $m$  le nombre d'allèles communs au même locus.

- La dernière est la méthode de co-inertie. Cette méthode présentée pour la première fois par Chessel et Mercier (1993) pour comparer un tableau faunistique et un tableau environnemental, et introduite en hydrobiologie par Dolédec et Chessel (1994) permet d'évaluer la concordance des structures de deux tableaux de données portant sur les mêmes points d'échantillonnage. Cette analyse dégage de chaque tableau un vecteur sur lequel sont projetés les points-relevés. Les deux jeux de coordonnées des projections des points-relevés résultants sont de covariance maximum, c'est-à-dire que le produit de la corrélation et des variances de chaque série de coordonnées est maximisé. Le calcul d'un indice appelé coefficient de corrélation vectoriel ou coefficient RV (Escoufier, 1973 ; Robert et Escoufier, 1976) permet de mesurer l'adéquation des deux tableaux de données. Sa signification statistique peut être vérifiée par des tests de permutations. Nous avons mené cette étude sur nos données chimiques et génétiques grâce au package Ade4 du logiciel R (Chessel *et al.*, 2005). Les données chimiques analysées étaient comme précédemment constituées par les moyennes des pourcentages d'aire des pics par population, en revanche pour les données génétiques, nous avons utilisé les fréquences alléliques.

Nous avons aussi mené une analyse de co-inertie au niveau individuel, en comparant l'Analyse en Composantes Principales menée sur les données chimiques et l'Analyse des Correspondances Multiples menée sur les données génétiques (allèles) prises comme des « caractères ».

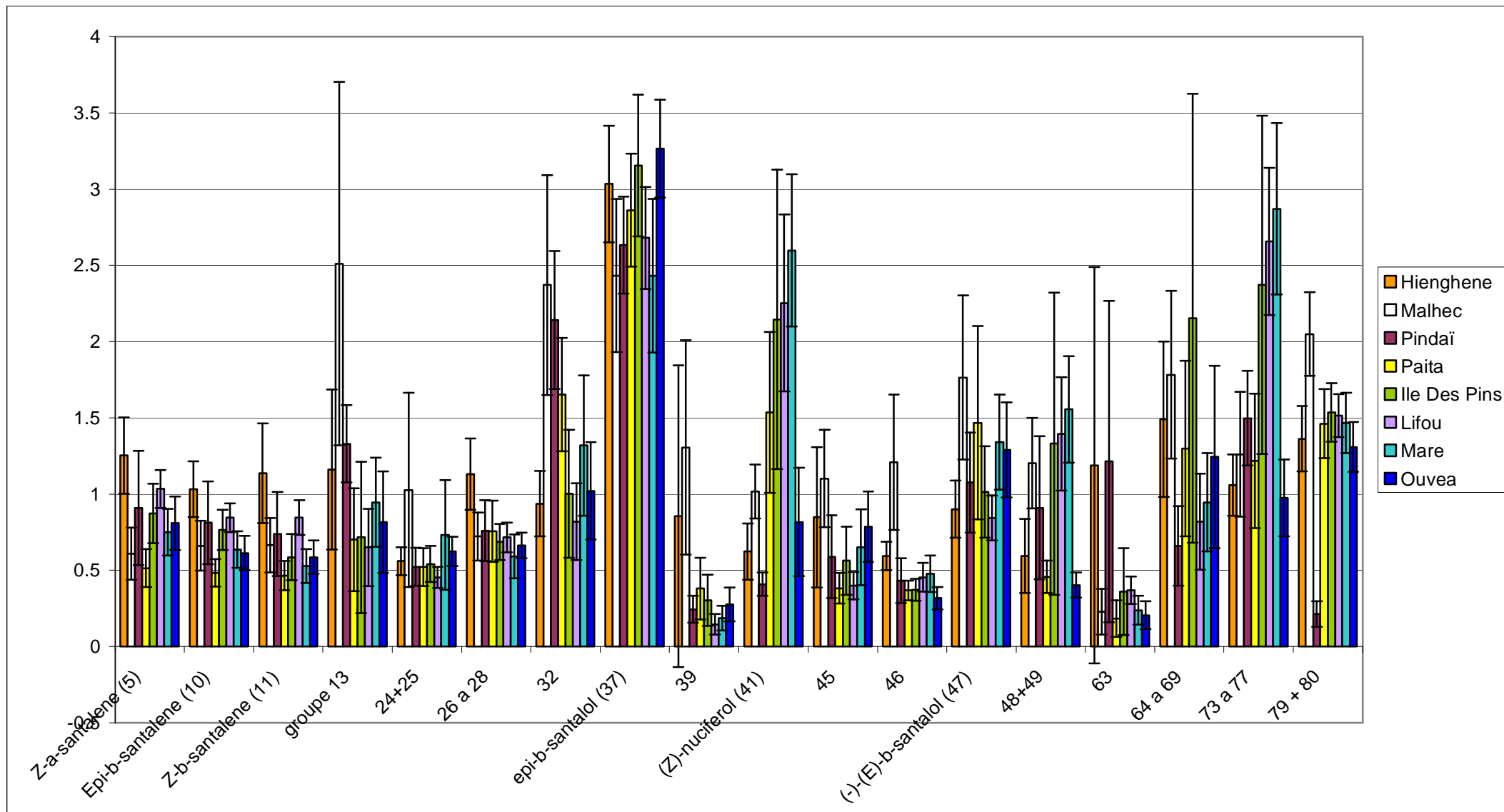
## 4.3. Résultats

### 4.3.1. Description de la variabilité sur l'ensemble de la Nouvelle-Calédonie

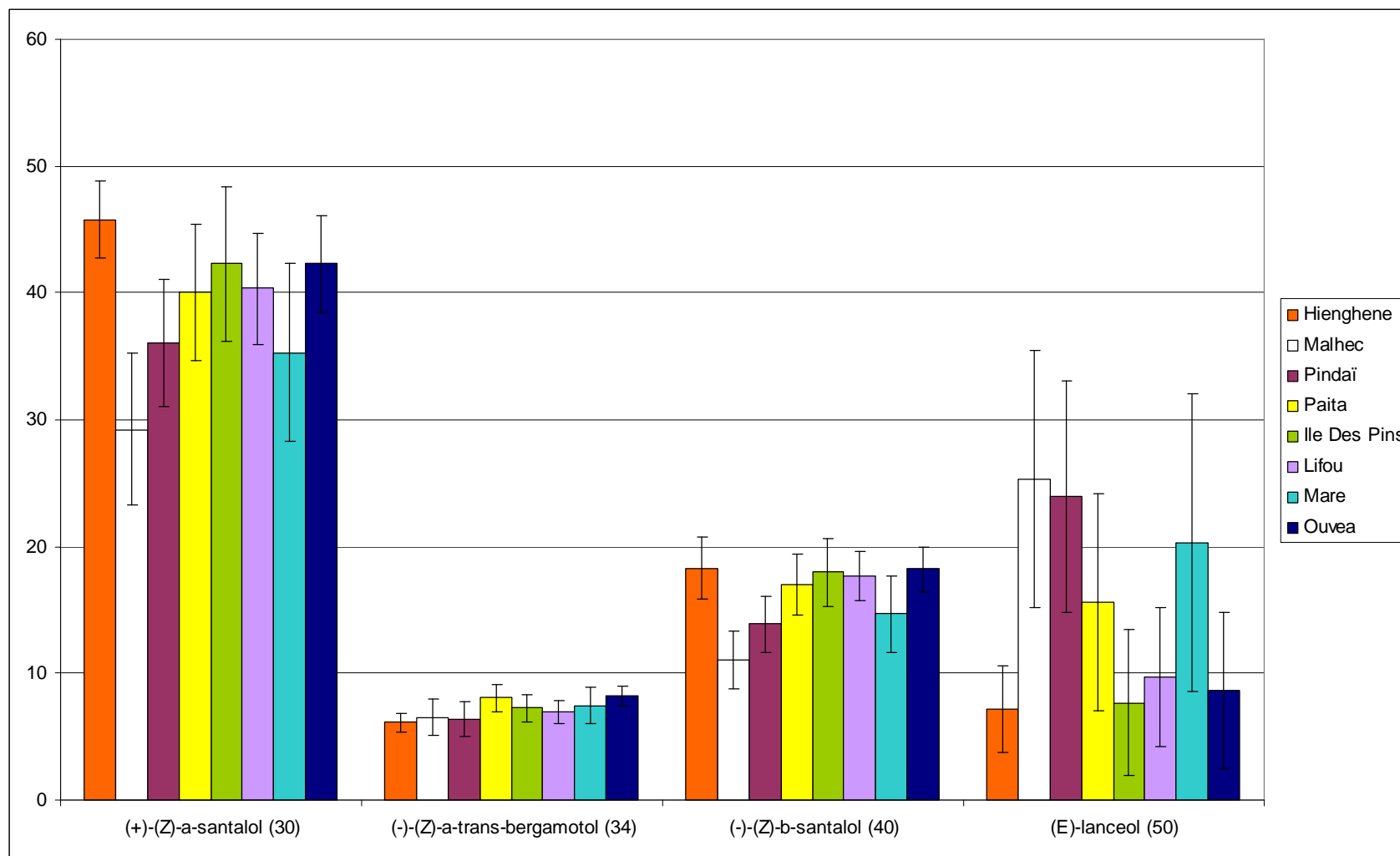
Les résultats des analyses statistiques de base sont présentés dans le tableau 4.3, et révèlent les mêmes composés majoritaires ( $\alpha$ -santalol et  $\beta$ -santalol) que dans les autres études chimiques sur le Santal, et le (E)-lancéol dont la forte teneur avait déjà été mise en évidence chez *S. austrocaledonicum* par Alpha (1997).



**Figure 4.6 a:** Pourcentages d'aire des pics par pic et par population pour les pics d'aire inférieure à 5% de l'aire totale de la concrète.



**Figure 4.6 b** : Pourcentages d'aire des pics par pic et par population pour les pics d'aire supérieure à 5% de l'aire totale de la concrète.



En moyenne, les alcools constituent 89.0% de la concrète, les hydrocarbures 3.56% et les diols 3.54%. Quatre molécules possèdent des aires supérieures à 5% de l'aire totale de la concrète : le (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol, le (Z)- $\alpha$ -transbergamotol, le (-)-(Z)- $\beta$ -santalol et le (E)-lancéol.

Les histogrammes en figure 4.5 montrent comment sont réparties les observations. Pour les molécules en très petite quantité dans la concrète, la résolution du chromatographe ne permet pas d'avoir une grande précision, aboutissant à répartir les informations en une seule classe. Pour les molécules en quantité importante en revanche, les répartitions sont variables, assez équilibrées autour de la moyenne pour certaines (ex : pic 34), déséquilibrées pour d'autres (ex : pic 30).

Le récapitulatif de matrice de corrélation (sur l'ensemble des individus) présenté en tableau 4.4 montre que 14 couples de molécules sont corrélés avec un coefficient de corrélation significatif supérieur à 0.8 ou inférieur à -0.8, ces couples corrélés le sont à l'intérieur du groupe des hydrocarbures ou de celui des mono-alcools.

#### **4.3.2. Variation inter et intra-population**

A première vue, les proportions de certains pics semblent assez variables selon les populations (figure 4.6), par exemple pour le groupe 13 ou le nuciférol. Les approches qui vont suivre vont permettre de préciser ce point.

##### **4.3.2.1. Approche multivariée**

###### ACP

Les deux principaux axes permettent d'expliquer plus de 46.6% de l'information (figure 4.7). L'axe F1 est majoritairement expliqué par le (Z)- $\beta$ -santalene (cosinus carré : 0.703) et dans une moindre mesure par les autres hydrocarbures, (Z)- $\alpha$ -santalene et epi- $\beta$ -santalene. L'axe F2 est lui majoritairement expliqué par le (-)-(Z)- $\beta$ -santalol (cosinus carré : 0.873), le Z- $\alpha$ -santalol (cosinus carré : 0.736), et le pic 32 (cosinus carré : 0.717).

La représentation des individus dans l'espace F1/F2 montre que la majorité des individus est regroupée au-dessus de l'axe F2, zone influencée par des teneurs fortes en santalols, et varie peu le long de l'axe F2. Par contre la population de Malhec ainsi que quelques individus des autres provenances sont fortement dispersés en dessous de l'axe F2, zone de plus faible teneur en santalols, et aussi très dispersés le long de l'axe F1, suggérant une grande variabilité sur les pics composant l'axe F1.

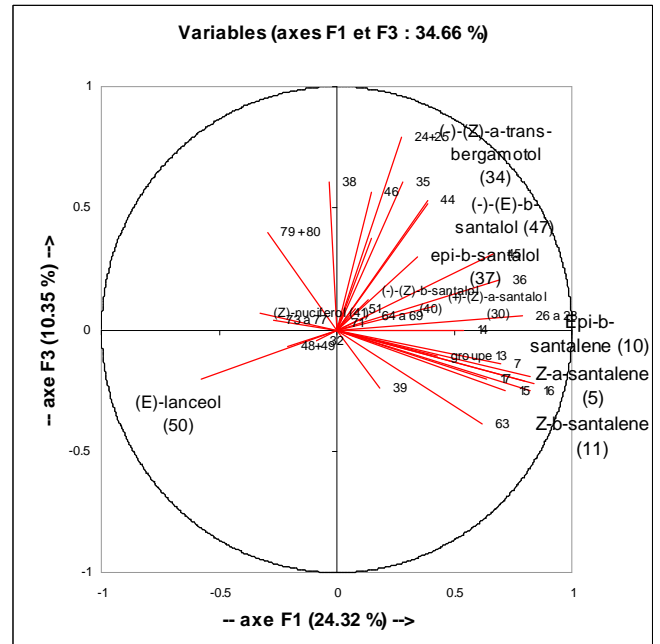
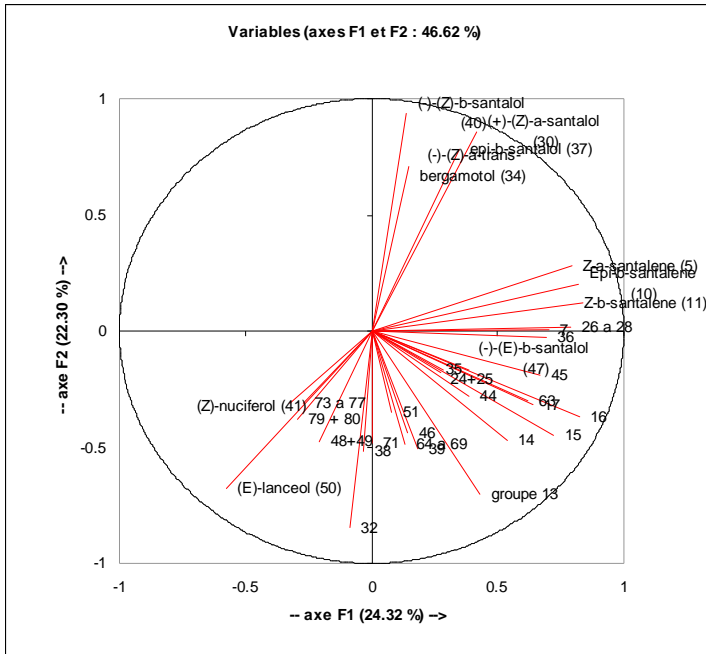


**Figure 4.7:** Résultats de l'Analyse en Composantes Principales intra-population (ACP).

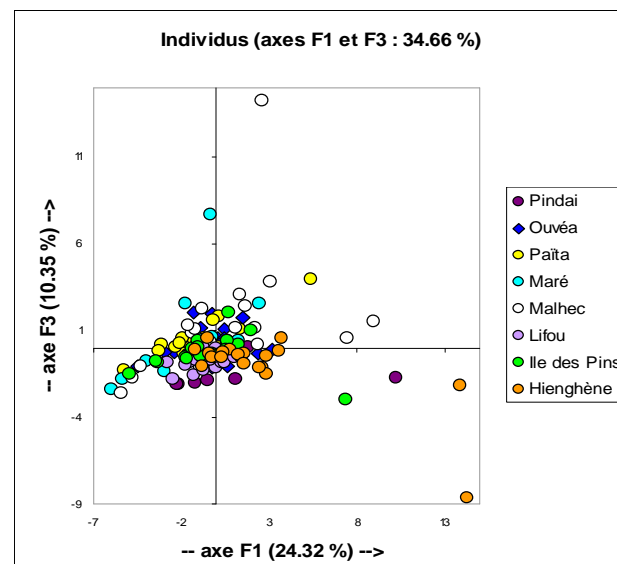
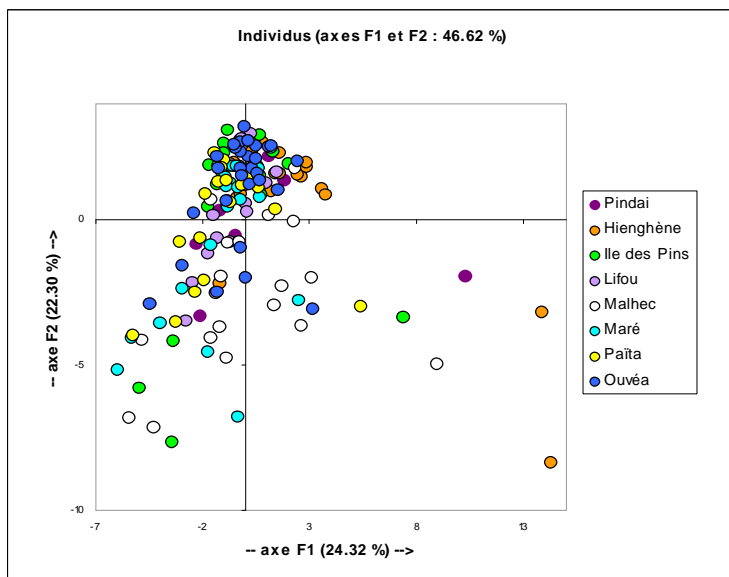
Valeurs propres des 4 premiers axes sur les 33 recensés.

	F1	F2	F3	F4
Valeur propre	8.025	7.359	3.414	2.426
% variance	24.318	22.299	10.345	7.353
% cumulé	24.318	46.617	56.962	64.315

Projection des variables sur les axes F1 et F2 expliquant 46.62% de la variation et sur les axes F1 et F3 expliquant 34.66% de la variation.



Représentation des individus sur les axes F1 et F2 puis F1 et F3 de l'ACP. Chaque couleur correspond à une population.

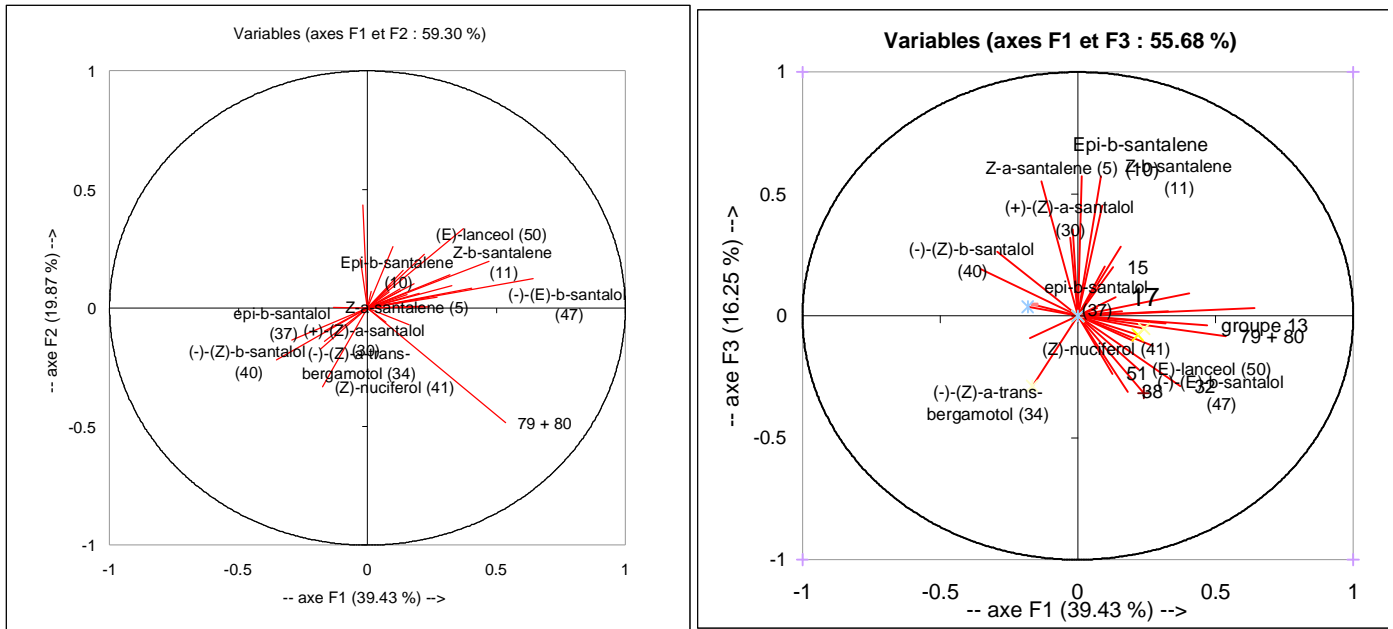


**Figure 4.8** : Résultats de l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) sur l'ensemble de la population

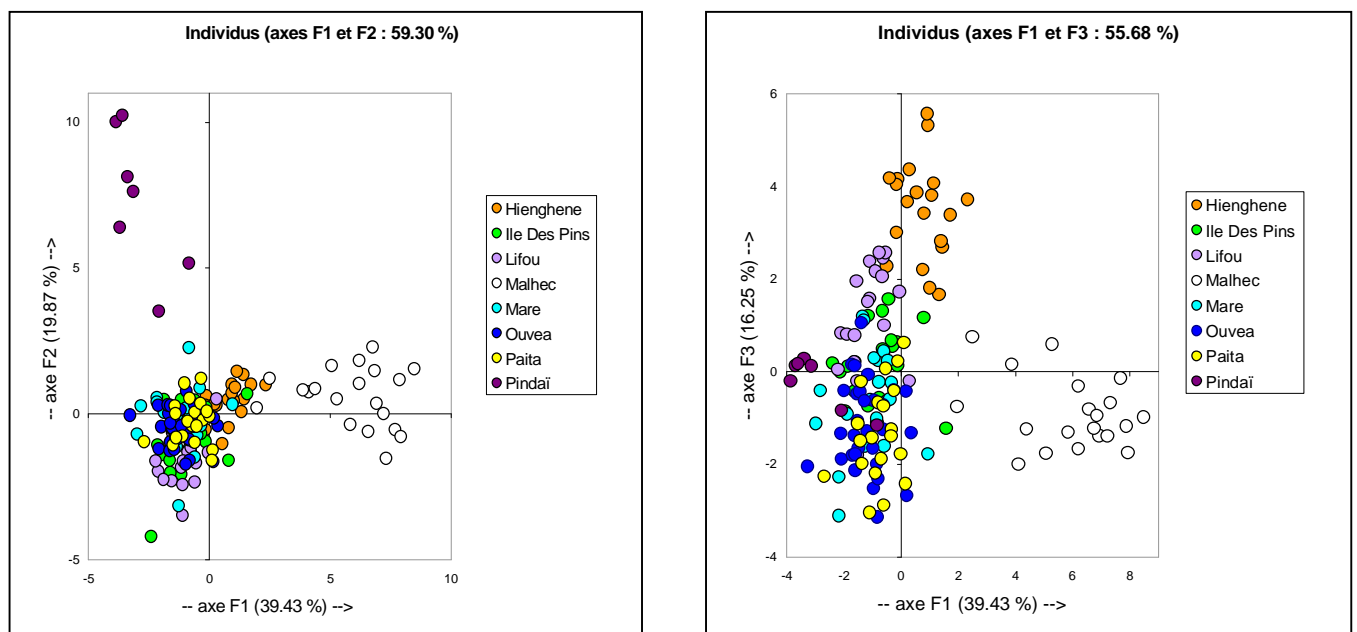
Valeurs propres et pourcentage de variance.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Valeur propre	6.035	3.041	2.487	1.488	1.094	0.655	0.506
% variance	39.431	19.868	16.248	9.721	7.150	4.276	3.307
% cumulé	39.431	59.298	75.546	85.267	92.417	96.693	100.000

Projection des variables sur les axes F1 et F2 expliquant 59.30% de la variation et sur les axes F1 et F3 expliquant 55.68% de la variation.



Représentation des individus sur les axes F1 et F2 , puis F1 et F3 de l'AFD. Chaque couleur correspond à une population.





La répartition des individus selon les axes F1/F3 est aussi présentée en figure 4.7 mais ne permet pas davantage de discrimination.

### AFD

#### Etude sur les 8 populations :

Le premier résultat est celui du test du Lambda de Wilks, qui permet de voir si les vecteurs des moyennes pour les différentes populations sont égaux ou non. Ici  $F= 1.184$ ,  $p<10^{-4}$ , donc au seuil de signification  $\alpha= 0.05$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'égalité des vecteurs espérances des 8 groupes. Autrement dit, la différence entre les barycentres des groupes est significative.

Trois axes suffisent à expliquer  $\frac{3}{4}$  de la variance (figure 4.8). Le graphique F1/F2 confirme ce que l'ACP laissait entrevoir concernant la population de Malhec : ses individus forment un groupe isolé, bien différencié, caractérisé par une faible teneur en  $\alpha$ -santalol, et la plus forte en (E)-lancéol. D'autre part, les individus de Pindaï se détachent aussi nettement du reste de la population et sont caractérisés par les plus faibles teneurs en molécules formant le pic 79+80. L'axe F2 étant très fortement influencé par le pic 79 + 80 qui caractérise la population de Pindaï, la représentation selon les axes F1/F3 donne une toute autre vision de la distribution des individus : ici Hienghène se dégage aussi des autres populations et forme un groupement défini par une grande proportion en dérivés de l' $\alpha$ -santalène (alcools et hydrocarbures).

Le test de Fisher associé aux carrés des distances de Mahalanobis entre groupes ne révèle cependant qu'une différence significative entre Hienghène et Ouvéa ( $F= 3.58$ ,  $P=0.004$ ) ainsi qu'entre Malhec et Ouvéa ( $F= 6.8$ ,  $P<10^{-4}$ ).

Pour les autres populations, la discrimination selon les axes n'est pas suffisante pour en tirer des conclusions.

#### Etude sur les 3 provenances : Grande Terre, Loyautés, et île des Pins

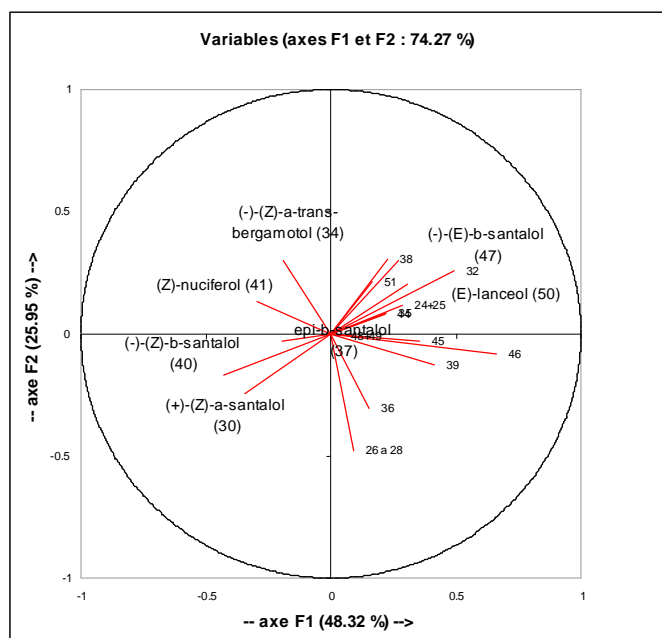
L'AFD sur ces 3 provenances montre là encore une grande significativité du test du Lambda de Wilks ( $F= 1.36$ ,  $P<10^{-4}$ ). Le graphique représentant les individus sur les axes F1 et F2 (figure 4.9) montre en effet une différenciation entre Grande Terre, les îles Loyauté, et l'île des Pins, Grande Terre tendant à être regroupée à gauche de l'axe F1, les Loyautés à droite de cet axe. Le test de Fisher est significatif entre tous les couples de provenances (entre Grande Terre et l'île des Pins,  $F= 3.47$ ,  $P<10^{-4}$ , entre Grande Terre et les Loyautés,  $F= 6.43$ ,  $P<10^{-4}$ , et entre l'île des Pins et les Loyautés,  $F= 1.80$ ,  $P= 0.039$ ). Les variables expliquant faiblement

**Figure 4.10 :** Résultats de l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) sur les alcools (19 pics) sur l'ensemble de la population

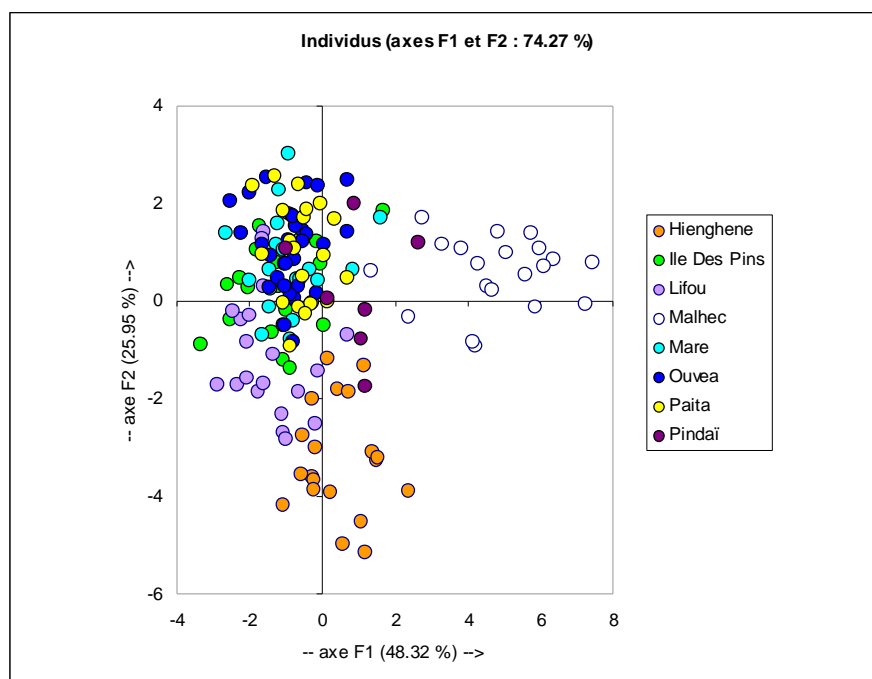
Valeurs propres et pourcentage de variance.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Valeur propre	3.916	2.103	0.827	0.646	0.283	0.185	0.144
% variance	48.319	25.948	10.209	7.971	3.490	2.287	1.776
% cumulé	48.319	74.267	84.476	92.447	95.937	98.224	100.000

Projection des variables sur les axes F1 et F2 expliquant 74.27% de la variation.



Représentation des individus sur les axes principaux de l'AFD. Chaque couleur correspond à une population



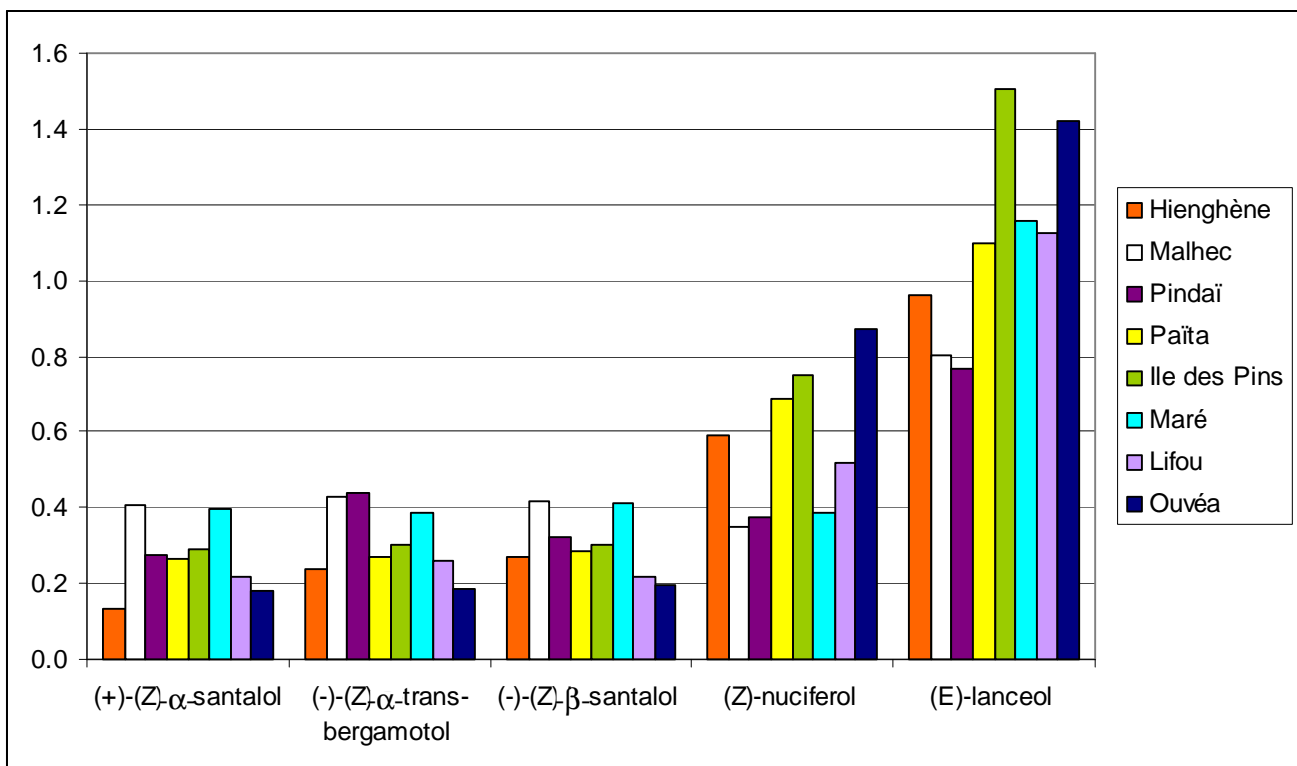
**Tableau 4.5**

Moyennes des molécules principales, et regroupement des populations pour chaque molécule après un test de Bonferroni (seuil de significativité : 5%). Chaque lettre correspond à un groupe.

	(+)-(Z)- $\alpha$ -santalol	(-)-(Z)- $\alpha$ -trans-bergamotol	(Z)-nuciférol	(-)-(Z)- $\beta$ -santalol	(E)-lanceol
<b>Hienghène</b>	45.79 c	6.11 a	0.62 a	18.3 a	7.16 a
<b>Malhec</b>	27.48 b	6.07 b	1.02 a	10.42 b	24.46 b
<b>Pindaï</b>	36.05 a	6.37 a	0.41 a	13.88 a	23.95 a
<b>Paita</b>	40.07 a	8.08 a	1.54 a	16.98 a	15.58 a
<b>Ile Des Pins</b>	42.26 a	7.27 a	2.15 b	17.97 a	7.69 a
<b>Mare</b>	35.29 a	7.42 a	2.6 c	14.68 a	20.35 a
<b>Lifou</b>	40.34 a	6.94 a	2.25 c	17.66 a	9.7 a
<b>Ouvea</b>	42.27 a	8.21 a	0.82 a	18.21 a	8.69 a

**Figure 4.11**

Histogramme des coefficients de variation (écart-type/moyenne) des molécules principales par population.



**Tableau 4.6**

Variance inter et intra population et pourcentage de variance inter population par rapport à la variance totale pour l'ensemble des pics, le diamètre et la hauteur (modèle mixte).

Dans la dernière colonne les résultats sont présentés uniquement les variables dont le modèle de décomposition de la variance est significatif ( $P < 0.05$ ).

Fonction	variable	variance inter population	variance intra population	variance inter / variance totale en %
	Diamètre	13.57	36.29	27.22
	hauteur	0.25	2.58	8.95
<b>Hydrocarbures</b>	(Z)- $\alpha$ -santalène (5)	0.05	0.14	25.80
	7	0.00	0.01	30.44
	Epi- $\beta$ -santalène (10)	0.03	0.08	24.67
	(Z)- $\beta$ -santalène (11)	0.04	0.12	25.37
	groupe 13	0.31	1.24	19.83
	14	0.01	0.07	7.74
<b>non déterminé</b>	15	0.00	0.07	
	16	0.00	0.06	5.79
	17	0.01	0.11	
<b>mono-alcools</b>	24+25	0.01	0.31	
	26 a 28	0.03	8.22	
	(+)-(Z)- $\alpha$ -santalol (30)	27.13	110.72	19.68
	32	0.42	1.00	29.34
	(-)-(Z)- $\alpha$ -trans-bergamotol (34)	0.49	4.87	9.06
	35	0.01	0.23	
	36	0.00	0.09	
	epi- $\beta$ -santalol (37)	0.09	0.69	11.80
	38	0.01	0.06	16.69
	39	0.31	1.86	14.15
	(-)-(Z)- $\beta$ -santalol (40)	6.70	23.04	22.52
	(Z)-nuciferol (41)	0.61	1.07	36.33
	44	0.00	0.02	7.86
	45	0.05	0.28	14.36
	46	0.08	0.13	38.68
(-)-(E)- $\beta$ -santalol (47)	0.07	0.57	10.61	
48+49	0.25	2.49	9.14	
(E)-lanceol (50)	37.54	245.53	13.26	
51	0.01	0.06	9.63	
<b>non déterminé</b>	63	0.09	1.14	7.16
	64 a 69	0.11	1.96	5.44
<b>Diols</b>	71	0.04	0.74	4.55
	73 a 77	0.54	1.18	31.37
	79 + 80	0.24	0.16	59.90







les axes, il est difficile de dire quels composants caractérisent les 3 groupes, cependant il semble que l' $\alpha$ -santalol soit en moyenne plus fréquent dans les îles Loyauté que sur Grande Terre et l'île des Pins.

#### Etude selon les groupes de molécules

Pour les résultats avec uniquement hydrocarbures ou alcools ou diols, les résultats de l'AFD montrent un nuage de points relativement indifférencié pour le jeu de données 'hydrocarbures' et 'diols', en revanche, l'AFD obtenue avec les alcools seuls (figure 4.10) présente des résultats proches de ceux obtenus avec le jeu de données complet de 33 pics, c'est-à-dire le détachement de Malhec et Hienghène.

#### **4.3.2.2. Comparaison des populations pour les molécules les plus présentes (modèle d'ANOVA à effets fixes)**

Les moyennes des principales molécules sont représentées dans la figure 4.5 précédemment citée. Les moyennes des 4 principaux pics ainsi que du nuciférol sont présentées pour chaque population dans le tableau 4.5. Ce tableau présente aussi les résultats des tests de Bonferroni qui montrent que la population de Malhec est significativement différente des autres pour les 4 pics les plus importants, et que Hienghène est significativement différente des autres populations concernant l' $\alpha$ -santalol. Les coefficients de variation au sein de chaque population sont représentés en figure 4.11. Les coefficients de variation du E-lancéol sont relativement plus forts que ceux des autres molécules. En revanche, il n'y a pas de population se détachant clairement des autres par une variabilité supérieure ou inférieure pour toutes les molécules.

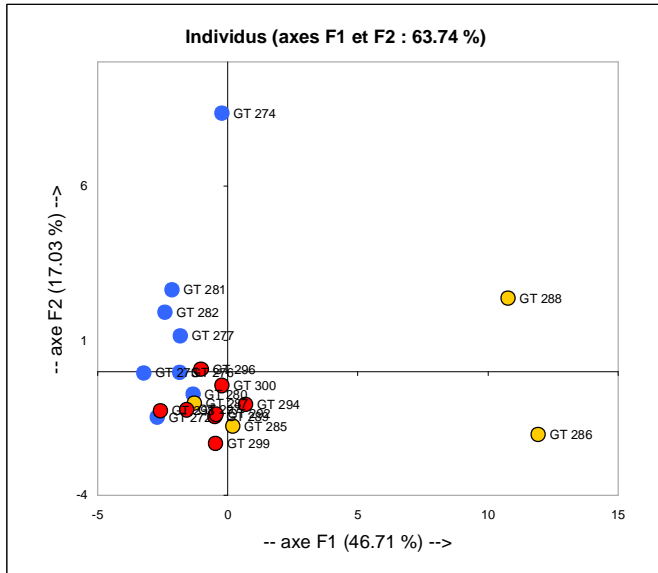
#### **4.3.3. Variation inter et intra-population par modèle à effets aléatoires**

L'analyse de variance par le modèle à effets aléatoires montre qu'en moyenne, 18.9% de la variance totale des pics est due aux différences entre populations. Pour presque toutes les variables (tableau 4.6), excepté le pic 79+80, la variance inter-population est inférieure à la variance intra-population. Pour les molécules principales, la proportion de variance inter-population est voisine de la moyenne des pics : (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol : 19.68%, (-)-(Z)- $\alpha$ -transbergamotol : 9.06 %, (-)-(Z)- $\beta$ -santalol : 22.52%, (E)-lanceol : 13.26%.

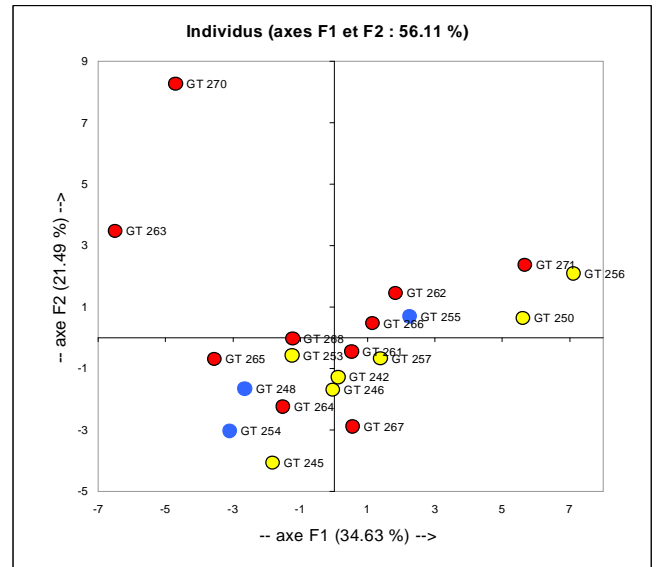
Les tableaux 4.7 a et b montrent, à titre indicatif, les matrices de corrélation inter et intra-population pour tous les couples de variables. La comparaison des 2 tableaux montre que pour

**Figure 4.12:** Résultat de l'Analyse en Composantes Principales intra-population (ACP) pour chaque population. Les individus sont représentés sur les axes principaux de l'ACP. Chaque couleur correspond à une sous-population : bleu = nord, jaune = centre, rouge = sud.

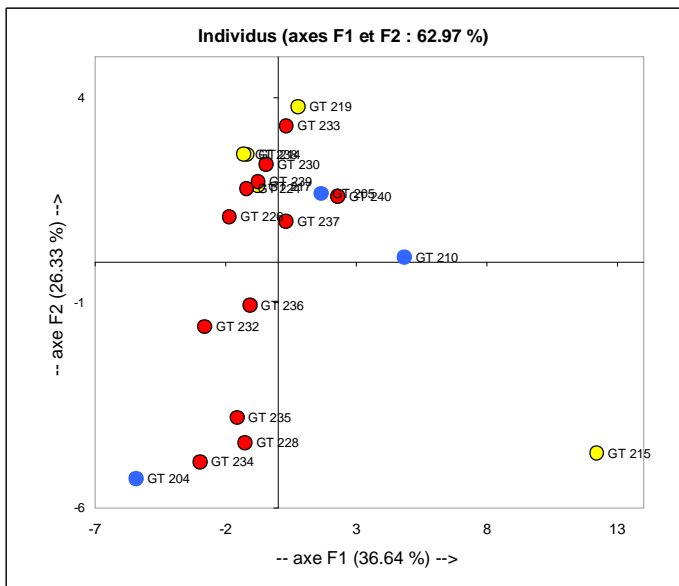
a/ Hienghène



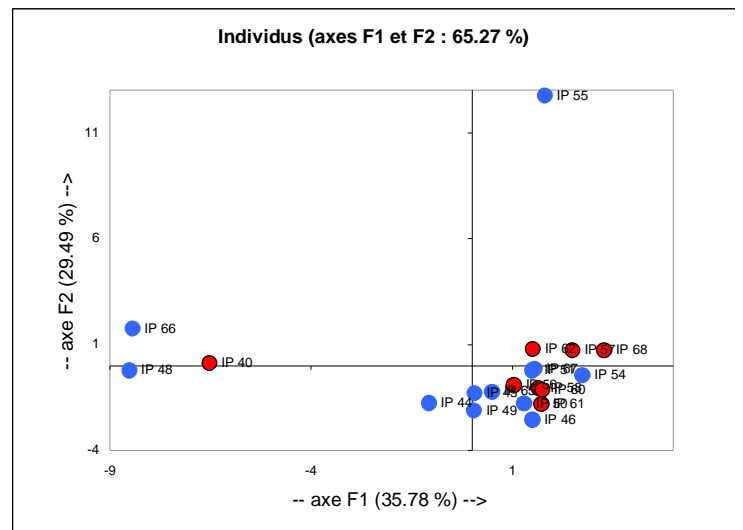
b/ Malhec

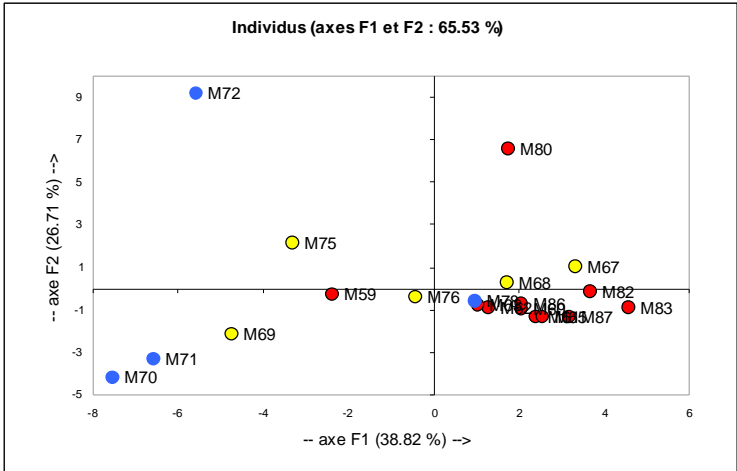


c/ Païta



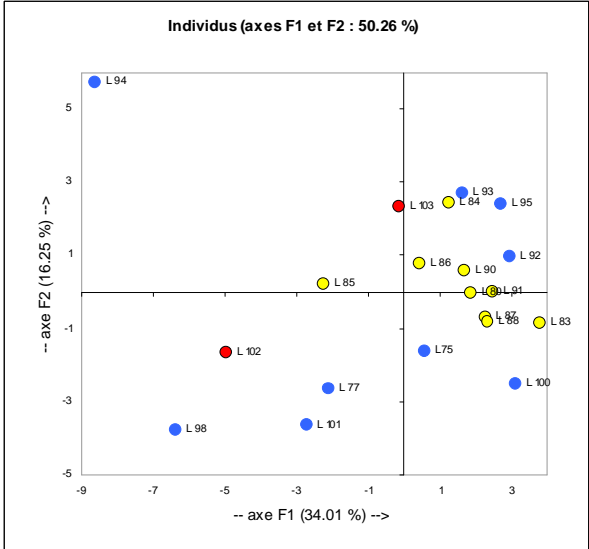
d/ Ile des Pins





e/ Maré

f/ Lifou



g/ Ouvéa

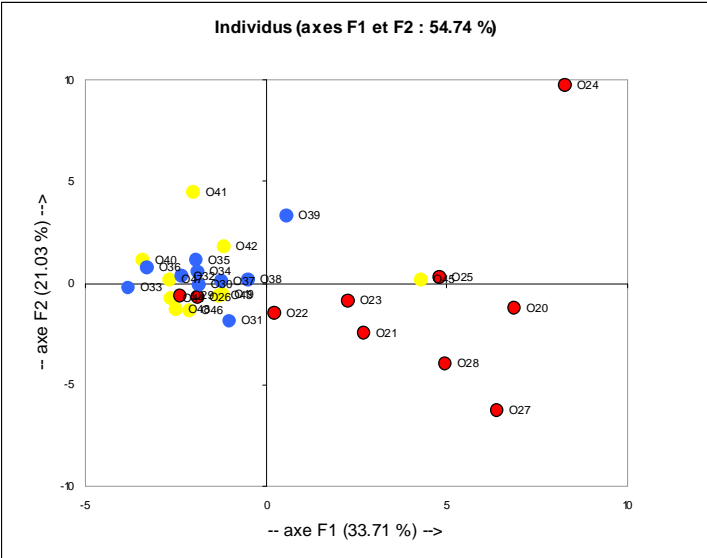
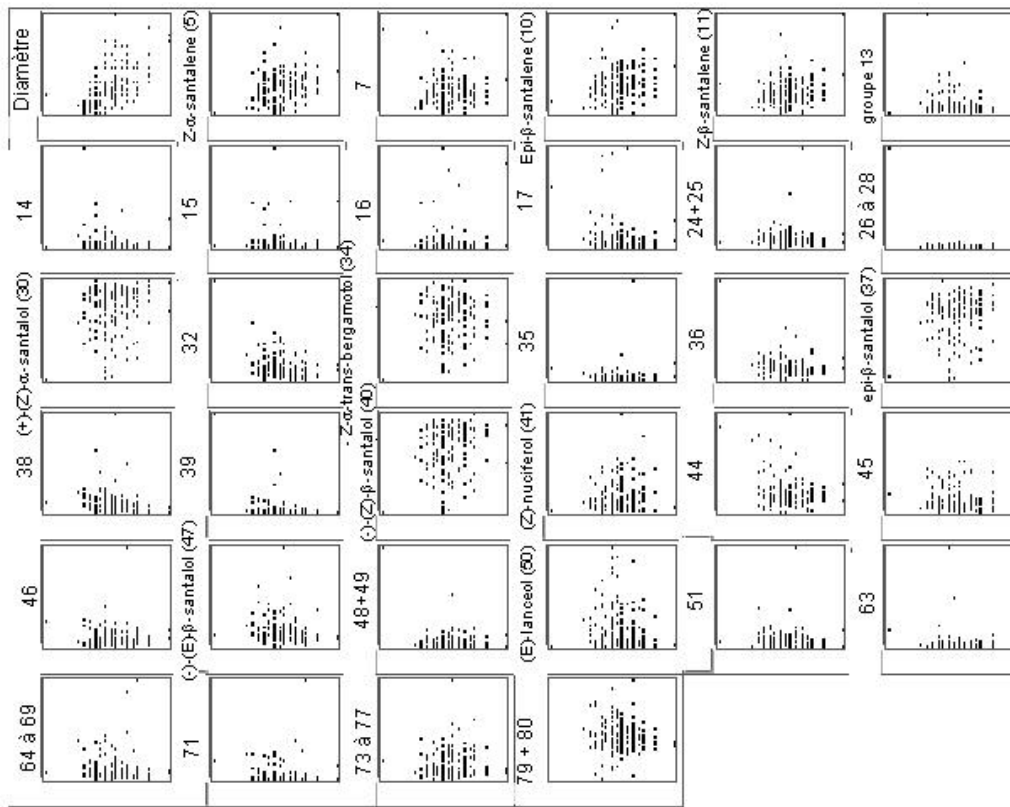
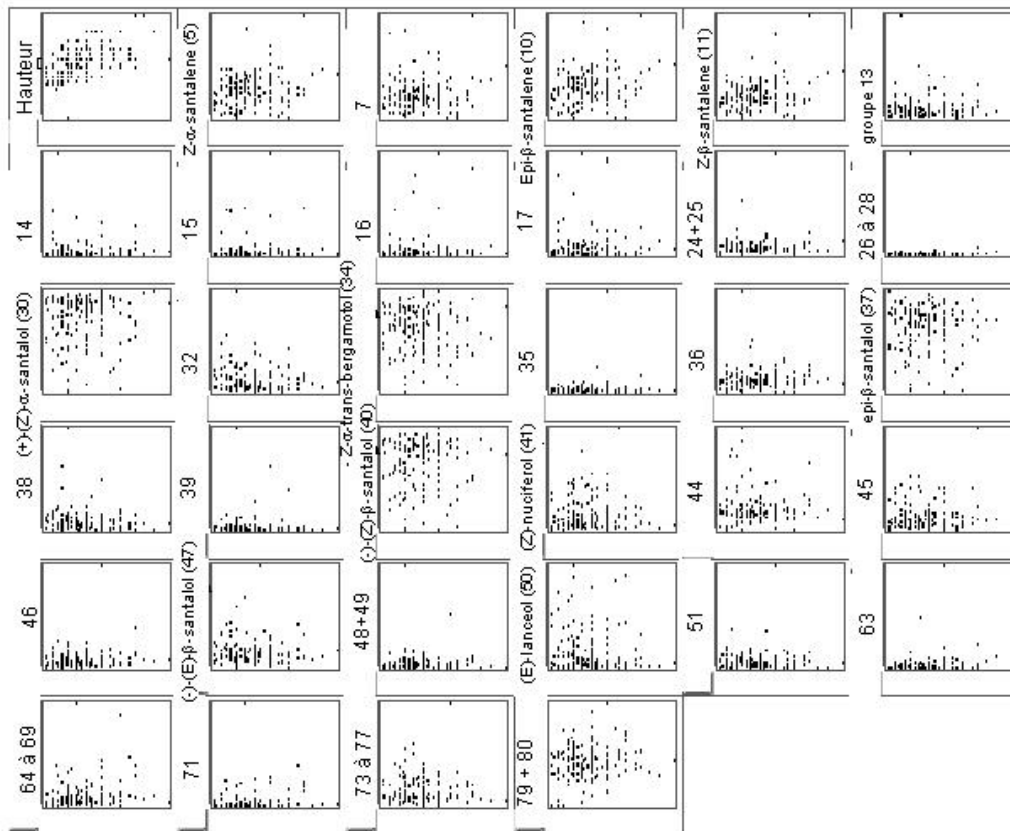


Figure 4.13 a/ corrélations entre hauteur et diamètre, et hauteur et aire de chaque pic dans la concrète.



13 b/ corrélations entre diamètre et hauteur, et diamètre et aire de chaque pic dans la concrète.



**Tableau 4.8**

Résultats des tests de corrélation de Pearson pour les moyennes par populations entre le diamètre, la hauteur et la pluviométrie, et les 33 pics. \*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001\*\*\*

coefficient de corrélation	diamètre	hauteur	pluviométrie
diamètre	1	0.78*	0.57
hauteur	0.78*	1	0.77*
(Z)- $\alpha$ -santalene (5)	0.25	0.47	0.75*
7	-0.35	-0.40	-0.14
Epi- $\beta$ -santalene (10)	0.32	0.37	0.66
(Z)- $\beta$ -santalene (11)	0.32	0.31	0.72*
groupe 13	-0.14	-0.58	-0.27
14	-0.06	-0.56	-0.29
15	0.30	0.03	0.51
16	-0.15	-0.45	-0.08
17	0.00	-0.47	-0.10
24+25	-0.16	-0.46	-0.24
26 a 28	0.49	0.25	0.61
(+)-(Z)- $\alpha$ -santalol (30)	0.46	0.68	0.64
32	-0.40	-0.85**	-0.76*
(-)-(Z)- $\alpha$ -trans-bergamotol (34)	-0.15	0.07	-0.26
35	0.05	-0.52	-0.46
36	0.52	0.20	0.61
epi- $\beta$ -santalol (37)	0.36	0.45	0.33
38	-0.42	-0.64	-0.60
39	0.31	-0.20	0.11
(-)-(Z)- $\beta$ -santalol (40)	0.43	0.75*	0.59
(Z)-nuciferol (41)	0.23	0.54	0.14
44	-0.05	-0.24	0.07
45	-0.07	-0.35	0.09
46	0.10	-0.31	-0.06
(-)-(E)- $\beta$ -santalol (47)	-0.25	-0.59	-0.57
48+49	0.02	0.18	0.00
(E)-lanceol (50)	-0.57	-0.84**	-0.72
51	-0.18	-0.55	-0.61
63	-0.03	-0.14	0.20
64 a 69	0.70	0.36	0.16
71	0.38	-0.09	-0.19
73 a 77	0.03	0.40	0.10
79 + 80	0.54	0.42	0.33

**Tableau 4.9 :** Résultats de l'Analyse de Variance (ANOVA) selon les modalités de sol pour les molécules principales. Regroupements (R ) effectués avec le test de Tukey HSD (Honestly Significantly Different),

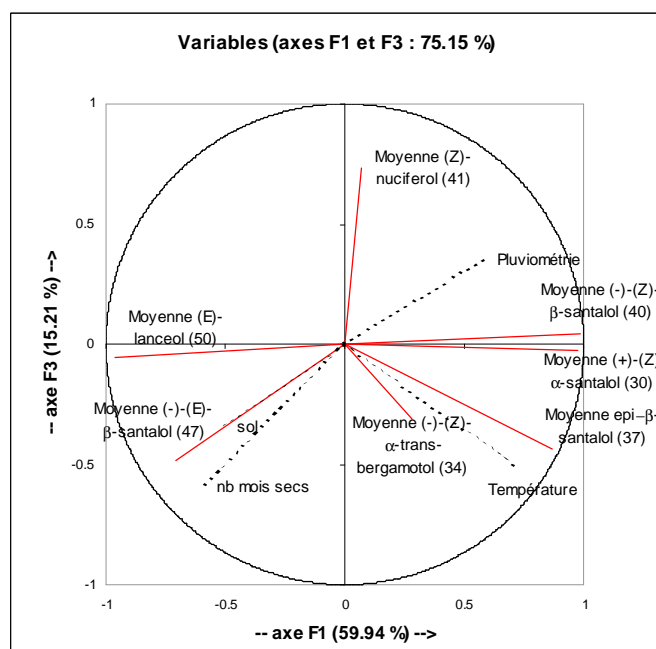
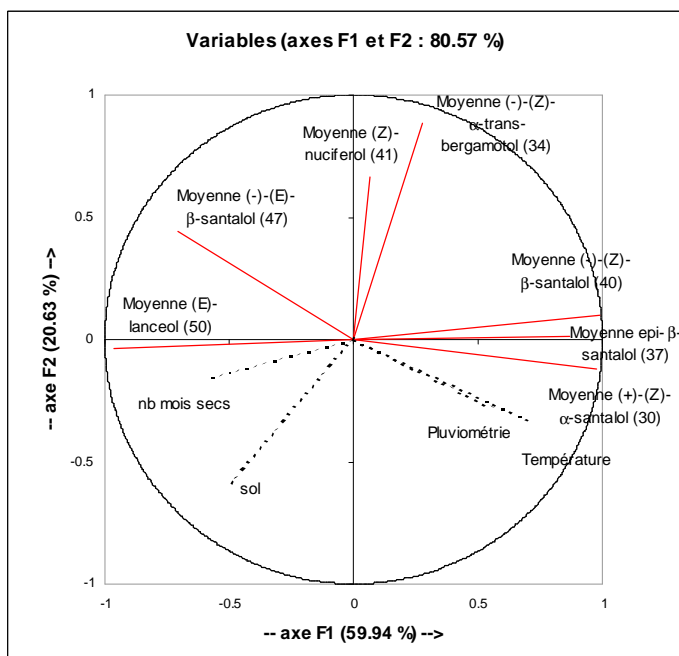
Modalités du sol	(+)-(Z)- $\alpha$ -santalol		(-)-(Z)- $\alpha$ -trans-bergamotol		(-)-(Z)- $\beta$ -santalol		(Z)-nuciferol		(E)-lanceol	
	Moyenne	R	Moyenne	R	Moyenne	R	Moyenne	R	Moyenne	R
calcaire	39.726	A	7.622	A	1.176	A	1.736	A	12.308	A
sable corallien consolidé	42.263	A	7.270	A	1.014	A	2.146	A	7.685	A
grès	42.930	A	7.096	A	1.185	A B	1.080	B	11.372	A
sol fersiallitique	29.237	B	6.530	A	1.764	B	1.017	B	25.323	B
alluvions	36.047	A B	6.367	A	1.076	A	0.409	B	23.953	A B

**Figure 4.14:** ACP sur les variables identifiées de la concrète et positionnement des variables abiotiques sur les axes de l'ACP.

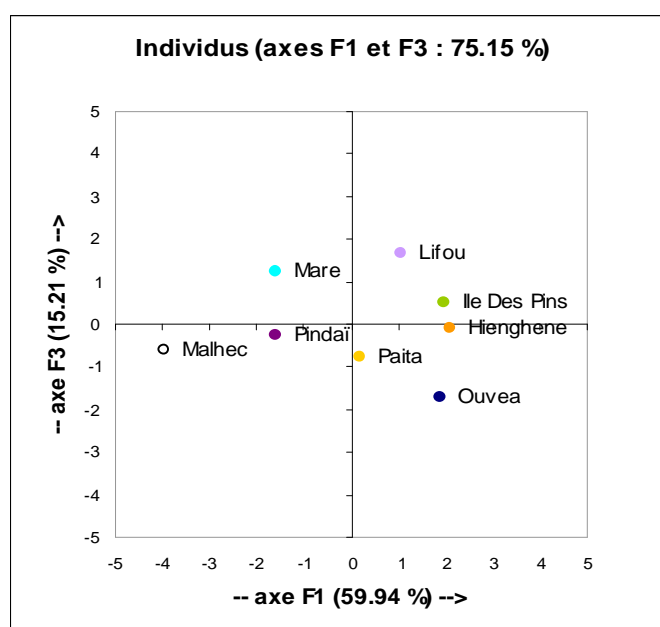
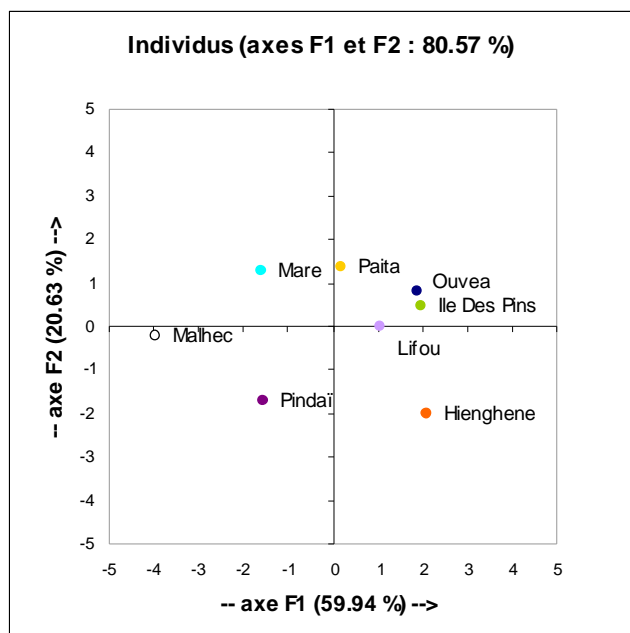
Valeurs propres et pourcentage de variance.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Valeur propre	4.196	1.444	1.065	0.177	0.084	0.034	0.001
% variance	59.945	20.626	15.210	2.529	1.200	0.481	0.010
% cumulé	59.945	80.570	95.780	98.309	99.510	99.990	100.000

Projection des variables sur les axes F1 et F2 expliquant 46.62% de la variation et sur les axes F1 et F3 expliquant 34.66% de la variation.

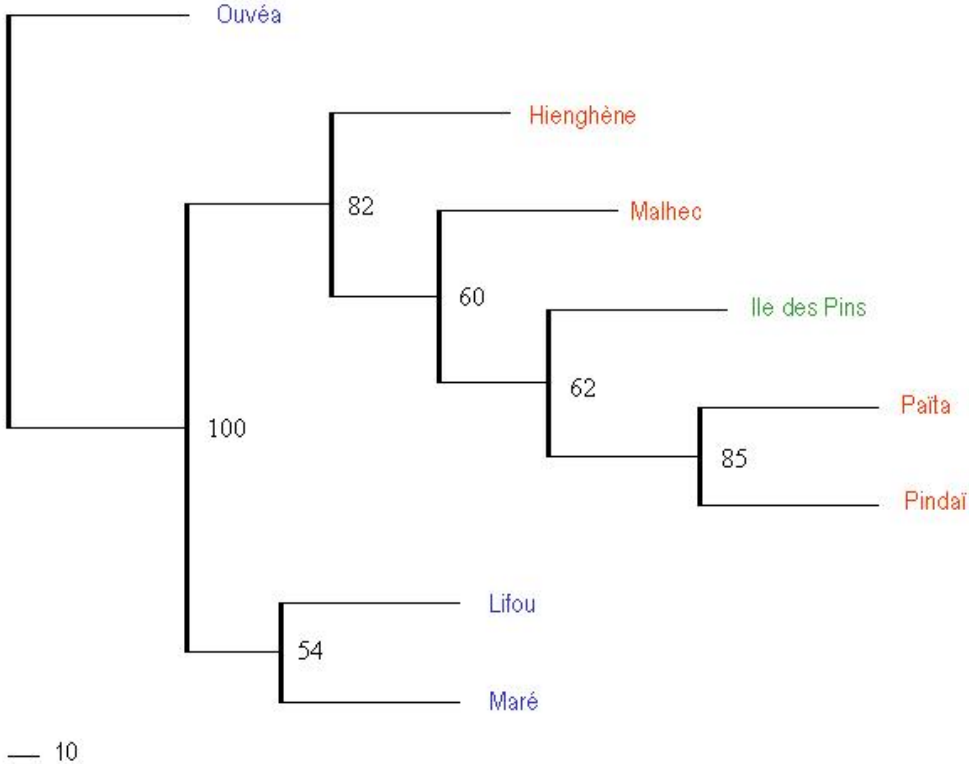


Représentation des individus sur les axes F1 et F2 puis F1 et F3 de l'ACP. Chaque couleur correspond à une population.

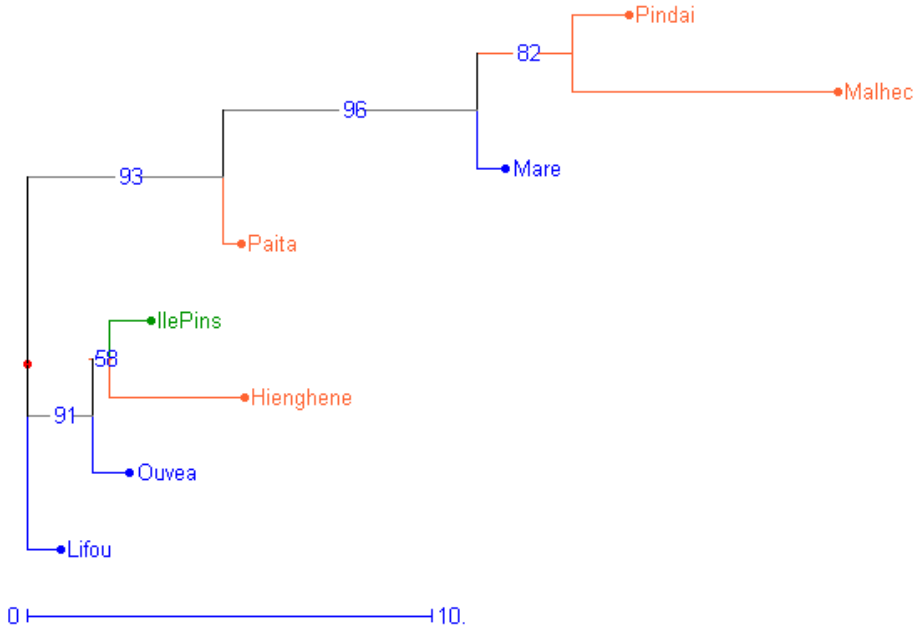


**Figure 4.15:** arbres des distances chimiques et génétiques entre populations. En rouge les populations de Grande Terre, en bleu celles des îles Loyauté.

a/ arbre des distances génétiques (microsatellites nucléaires)



b/ arbre des distances chimiques







49.4% des couples de pics, la corrélation intra-population est supérieure à la corrélation inter-population.

Il semble difficile d'établir des comparaisons entre les différents groupes de molécules (hydrocarbures, alcools, diols) pour la variance comme pour les autres paramètres, le groupe 'alcools' ayant beaucoup plus de molécules (19) que les hydrocarbures (6) et les diols (3).

#### **4.3.4. Distribution spatiale intra-population : approche multivariée**

Les résultats sont présentés pour chaque population en figure 4.12. Dans l'ensemble, on ne retrouve pas dans les graphiques de l'ACP la structuration en sous-populations géographiques. Cependant, pour Ouvéa il semble que la population 'Sud' se détache légèrement du reste des individus.

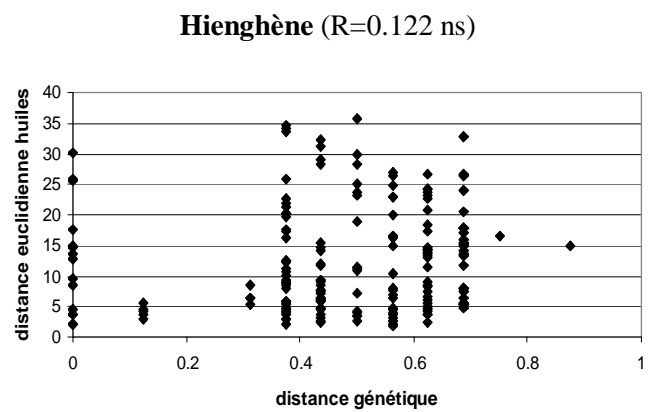
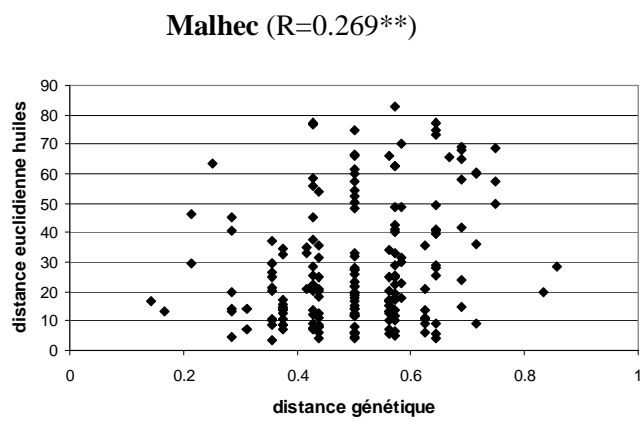
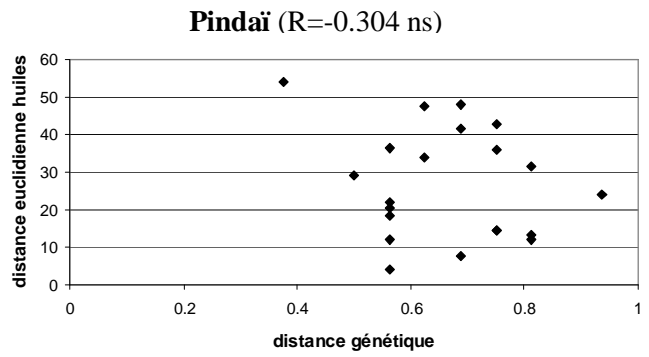
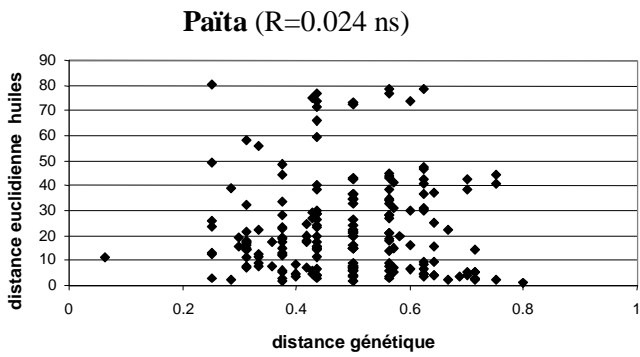
#### **4.3.5. Relation avec la variable biologique « taille de l'arbre » et avec les variables abiotiques.**

- Les relations diamètre/aires des pics et hauteur/aire des pics sont présentées en figure 4.13 a et b et sont généralement peu ou pas significatives, comme en témoigne le coefficient de Pearson dans le tableau 4.8. Le diamètre n'est corrélé de façon significative avec aucun pic, et la hauteur est corrélée à 3 pics : le pic 32 ( $r = -0.85^{**}$ ), le (-)-(Z)- $\beta$ -santalol ( $r = 0.75^*$ ) et le e-lancéol ( $r = -0.84^{**}$ ). La hauteur et le diamètre sont aussi fortement corrélés entre eux ( $r = 0.78^*$ ). Cependant, en effectuant la correction de Bonferroni aucune de ces valeurs n'est significative.
- Concernant les facteurs climatiques et édaphiques, la pluviométrie est uniquement corrélée à deux pics : le (Z)- $\beta$ -santalene ( $r = 0.72^*$ ), ainsi que le pic 32 ( $r = -0.76^*$ ). Elle est aussi fortement corrélée à la hauteur ( $r = 0.77^*$ ). L'ANOVA (tableau 4.9) montre que seul le sol fersiallitique (présent à Malhec) a un effet différent des autres sur la composition chimique. L'ACP montre que les variables abiotiques (figure 4.14) ne semblent pas nettement corrélées aux variables chimiques, cependant, pluviométrie et température paraissent corrélées au (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol, comme suggéré par les coefficients de Pearson.

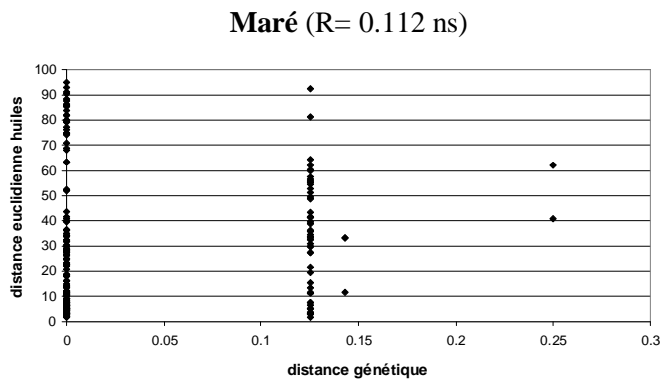
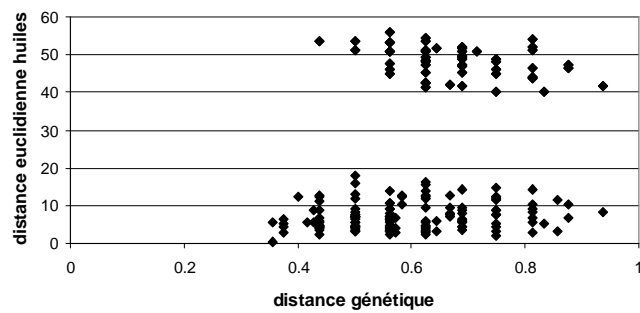
#### **4.3.6. Relation avec la variabilité moléculaire.**

La comparaison entre les arbres de distances génétiques et chimiques entre populations (figure 4.15) montre une structuration tout à fait différente. Avec les données génétiques, les populations de Grande Terre s'avèrent très proches les unes des autres, ainsi que de l'île des

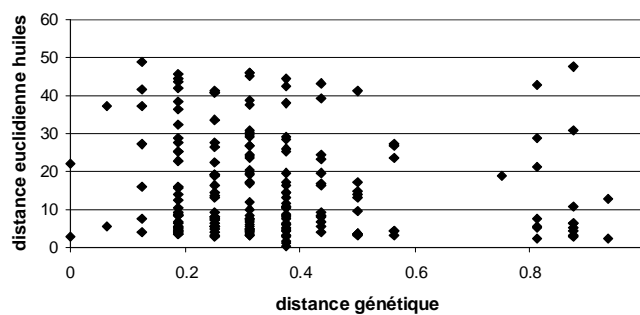
**Figure 4.16:** Tests de Mantel par population entre les distances génétiques calculées par «simple matching» sur les données alléliques, et les distances euclidiennes pour les 20 composés principaux de la concrète. R= coefficient de corrélation, P=probabilité du test de Mantel. ns : non significatif, \*:P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001.



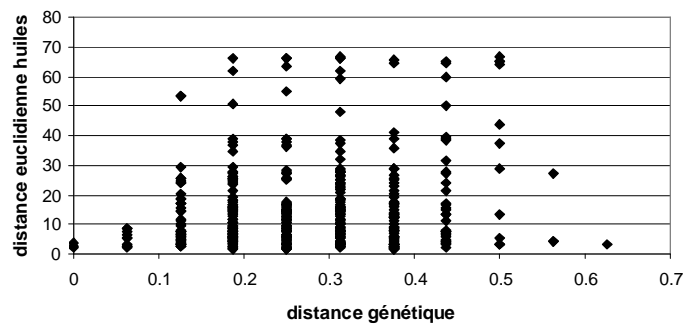
**Ile des Pins** (R=0.273\*)  
*(le groupe supérieur correspond aux couples de distances comprenant les individus 1, 5 et 18 à forte teneur en lancéol)*



**Lifou** (R=-0.078 ns)



**Ouvéa** (R=0.155 ns)



Pins. En revanche, l'arbre des distances chimiques montre un éclatement de cette structuration, Maré étant proche de plusieurs populations de Grande Terre, exceptée Hienghène qui avec l'île des Pins, sont plus proches de Lifou et Ouvéa.

Les tests de corrélations entre matrices de distances intra-populations sont dans l'ensemble très faibles ou non significatifs (figure 4.16). Le coefficient de corrélation pour l'ensemble des individus est  $r = 0.091^*$  ( $P < 0.05$ ), pour les populations prises indépendamment il n'est significatif que pour Malhec ( $r = 0.269^{**}$ ) et l'île des Pins ( $r = 0.273^*$ ) ; et entre populations il n'est pas significatif ( $r = 0.257$ ,  $P = 0.117$ ).

Concernant l'analyse de co-inertie, le coefficient RV de corrélation entre l'ACP sur les fréquences alléliques et celle sur les proportions moyennes de molécules est fort mais faiblement significatif au seuil des 5% ( $RV = 0.72^*$ ,  $P = 0.047$ ). En revanche, pour l'analyse sur l'ensemble des individus, le coefficient est faible et non significatif ( $RV = 0.155$ ,  $P = 0.012$ ).

**Tableau 4.10**

Comparaison des compositions en huiles essentielles pour 5 molécules d'intérêt entre 3 espèces de santal différentes

(source : [http://www.ultimatewatermassage.com/oils/sandalwood\\_mysore.htm](http://www.ultimatewatermassage.com/oils/sandalwood_mysore.htm))

	<i>S. spicatum</i>	<i>S. album</i>	<i>S. austrocaledonicum</i>
(+)-(Z)- $\alpha$ -santalol	25%	50%	40.80%
(-)-(Z)- $\alpha$ -trans-bergamotol	5%	3%	7.50%
(-)-(Z)- $\beta$ -santalol	11%	20%	17%
(Z)-nuciferol	11%	1%	1.50%
(E)-lanceol	2%	2%	14.20%

## 4.4. Discussion

### 4.4.1. Caractéristiques de la concrète calédonienne, et explication des pics

La composition chimique de la concrète de Santal calédonien apparaît proche de celle des Santals des Fidji (Smith *et al.*, 1979), Inde (Semmler *et al.*, 1910), et Polynésie Française (Butaud, 2003), pour ce qui est de la prépondérance des santalols. Par ailleurs, elle se caractérise par une teneur élevée en lancéol (tableau 4.3 : pourcentage dans la concrète : 13.66% ; tableau 4.10 : pourcentage dans l'huile essentielle 14.2%) comme suggéré par Alpha (1997c) qui avait trouvé un pourcentage de 26.8% dans la concrète. Concernant sa qualité, celle-ci est jugée bonne d'après les critères de Verghese *et al.* (1990), qui définissent une huile comme bonne lorsque la teneur en (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol est comprise entre 40 et 55% (40.8% dans notre cas), et la teneur en (-)-(Z)- $\beta$ -santalol entre 17 et 27% (17% dans notre cas). Les proportions de santalol de notre étude sont en accord avec celles trouvées par Ehrhart (1998) chez *S. austrocaledonicum* au Vanuatu ( $\alpha$ -santalol : 47.5%,  $\beta$ -santalol : 24.5%), mais de récentes études (Page, comm. pers.) montrent des résultats différents entre la Nouvelle-Calédonie et le Vanuatu, avec, pour le Vanuatu, des teneurs plus faibles en (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol (les valeurs variant de 6 à 41% selon les populations du Vanuatu), et plus forts en nuciférol (2 à 17%), ce qui tendrait à confirmer les différences entre l'espèce calédonienne et vanuataise soulevées au chapitre 1.

Les histogrammes de fréquence des aires (figure 4.6) montrent que les pourcentages d'aire les plus fréquents pour les santalols sont ceux qui sont les plus élevés. Ceci suggère qu'il existe un pourcentage 'limite' de santalols, c'est-à-dire les molécules les plus recherchées pour la production d'huile, dans la concrète de *Santalum austrocaledonicum*, par exemple le pourcentage maximal en (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol est 53.34%, pour le (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol, 24.28%.

La matrices de corrélation (tableau 4.4) montrent que certaines molécules sont très fortement corrélées. Lorsque la structure de ces molécules est connue, on remarque que les molécules corrélées positivement sont celles de même squelette (par exemple (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol et  $\beta$ -santalol ont le même squelette santalane) et les molécules corrélées négativement sont de squelettes différents (par exemple (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol et (E)-lancéol sont respectivement de squelette santalane et bisabolane). En effet, les molécules à squelette identique sont susceptibles d'être corrélées positivement entre elles, car elles sont issues de la même chaîne de biosynthèse (figure 4.2) et ont donc de nombreuses enzymes de biosynthèse en commun. Inversement des molécules issues de chaînes de biosynthèse différentes ont des chances d'être



corrélées négativement car les enzymes utilisées dans une chaîne de biosynthèse pourraient être produites au détriment de celle de l'autre chaîne de biosynthèse, et la molécule précurseur étant en quantité limitante, la voie de biosynthèse ayant le plus grand nombre d'enzymes sera la plus efficace. Rappelons que dans le cas particulier du bois de Santal, les principaux squelettes de molécules rencontrés dans la partie volatile de la concrète sont le santalane, le bergamotane et le bisabolane. Les molécules de types santalane sont négativement corrélées à celles de type bisabolane, et confirmeraient donc cette hypothèse de « concurrence » pour un même précurseur. En revanche, l'unique molécule de type bergamotane n'est pas corrélée aux autres squelettes, on peut donc faire l'hypothèse que sa voie de biosynthèse n'a aucune enzyme commune ou en compétition avec les enzymes des voies santalane et bisabolane.

L'analyse selon les groupes de molécules (hydrocarbures, mono-alcools, et diols) ne montre pas les mêmes résultats, mais il est risqué d'en déduire une structuration chimique différente selon ces groupes car les groupements hydrocarbures et diols contenaient beaucoup moins de pics et d'aire en moyenne moins importante que les pics du groupement des alcools et étaient donc moins informatifs.

Avant d'interpréter les résultats suivants, nous avons tenu à vérifier que les résultats n'étaient pas influencés par la taille de l'échantillonnage. Une observation des coefficients de variation intra-population (figure 4.11) nous montre que ceux-ci sont assez similaires, qu'ils s'agisse d'un faible échantillonnage comme à Pindaï (7 individus) ou d'un plus large échantillonnage à Ouvéa (40 individus). La comparaison des résultats entre populations nous apparaît donc parfaitement justifiée.

#### 4.4.2. Caractérisation chimique des populations

L'analyse chimique des molécules volatiles de la concrète de *S. austrocaledonicum* a permis de mettre en évidence la singularité de deux populations : Malhec et Pindaï, et dans une moindre mesure, Hienghène.

Malgré la très forte variabilité intra-population du (E)-lancéol, (figure 4.11) la population de Malhec en possède des teneurs nettement supérieures à celle des autres populations. Le (E)-lancéol est une molécule à faible odeur de Santal. Etant donnée sa corrélation négative avec le (+)-(Z)- $\alpha$ -santalol, le (-)-(Z)- $\beta$ -santalol et l'epi- $\beta$ -santalol, on peut déduire qu'elle est produite au détriment de ces deux molécules qui sont un critère de bonne qualité du bois de Santal. Malhec semble donc être une provenance de qualité moindre pour le bois de cœur, cependant sa singularité chimique incite à maintenir cette population et ne pas la mélanger à d'autres afin de maintenir la diversité chimique au sein de l'archipel.





L'autre population présentant, sur l'AFD, un isolement par rapport aux autres est Pindaï. Celle-ci présente une teneur plus faible que les autres en molécules du pic 79+80, engendrant une variance inter-population pour cette molécule supérieure à la variance intra-population. Ce pic correspond à une molécule du groupe des diols, qui n'est donc pas présente dans l'huile essentielle de Santal, mais seulement dans la concrète. La faible teneur en cette molécule n'affecte donc pas la qualité du bois de cœur. Cependant, comme pour la population de Malhec, cette singularité chimique suggère de conserver cette population isolée des autres. Enfin, Hienghène, dont l'isolement a été mis en évidence dans la première AFD, est caractérisée par une plus forte teneur en dérivés de l' $\alpha$ -santalène (alcools et hydrocarbures) que les autres. Les hydrocarbures sont des molécules sans odeur, en revanche l' $\alpha$ -santalol, dérivé de l' $\alpha$ -santalène est un critère de qualité du bois. Hienghène est donc elle aussi une population singulière à maintenir isolée afin de préserver la diversité, et pourrait aussi avoir une huile essentielle de meilleure qualité que les autres populations.

Nous avons relancé des analyses en ôtant Malhec, Hienghène et Pindaï, afin de voir si l'originalité des individus de cette population ne conduisait pas à effacer les différences entre autres populations. Les résultats de ces analyses, non présentés ici, ne montrent pas d'amélioration dans la distinction des populations.

La variabilité des huiles essentielles entre populations est une constatation commune à de nombreuses études, par exemple chez *Thymus baeticus* (Saez, 1999), *Thymus villosus* (Salgueiro *et al.*, 2000) ou encore *Melaleuca quinquenervia* (Ireland, 2002). Pour ces 3 exemples les populations étudiées se situaient à des distances comparables à celles entre les populations de notre étude. Comme le Santal, ces espèces produisent une huile essentielle prisée en parfumerie ou pharmacie, et l'étude de la variabilité chimique permet de déceler des populations de qualité différente pour l'exploitation. Chez *S. austrocaledonicum*, l'étude montre que les populations de meilleure qualité, c'est-à-dire plus riches en  $\alpha$ - et  $\beta$ -santalol, sont Hienghène et l'île des Pins. Il est à noter que la molécule d' $\alpha$ -santalol a récemment été reconnue pour son effet préventif sur le développement des cancers de la peau (Dwivedi *et al.*, 2003 et 2005) et son abondance dans certaines populations pourrait donc revêtir un intérêt pharmaceutique de grande importance. D'autre part, *S. austrocaledonicum* étant une espèce menacée, il s'ajoute aussi le critère de conservation qui conduit à privilégier certaines populations à conserver pour leurs particularités : Malhec, Hienghène, et Pindaï.



#### 4.4.3. Distribution de la variabilité entre et au sein des populations

La variabilité inter-population explique seulement 18.9% de la variance totale des pics. Ce résultat est très voisin de celui habituellement observé chez les espèces forestières pour les caractères quantitatifs, c'est-à-dire 20% (Sanou *et al.*, Tripiana *et al.*, soumis). Il s'agit d'une moyenne sur tous les pics, mais les principales molécules présentent peu de différences avec ce pourcentage.

Les résultats des analyses sur les molécules principales montrent que ces dernières possèdent des coefficients de variation intra-population similaires, sauf pour le E-lancéol pour lequel les coefficients sont très élevés. Le E-lancéol, molécule dont la fréquence caractérise la concrète de *S. austrocaledonicum* par rapport à celles d'autres Santals, est donc en proportion très variable à l'intérieur des populations, mais nous ne pouvons pas pour l'instant proposer d'hypothèse pour expliquer cette variabilité.

La variance intra-population explique près de 81.1% de la variance totale des pics. Les résultats intra-population ne permettent pas de dresser de conclusion quant à la distribution spatiale de la variabilité chimique à l'intérieur des populations. La seule structuration observée est celle de la partie Sud d'Ouvéa. Ce résultat peut être interprété par la combinaison de deux facteurs. D'une part, la structuration géographique joue un rôle certain, car la partie Sud d'Ouvéa correspond sur le terrain à une petite île séparée d'Ouvéa sur laquelle un processus d'adaptation ou de sélection naturelle a pu intervenir. D'autre part, Ouvéa étant l'île qui possède le plus gros échantillonnage (30 individus), il est probable que le nombre d'individus dans les autres populations ait été insuffisant pour montrer une telle structuration.

#### 4.4.4. Comment expliquer la variabilité chimique au sein de l'espèce ?

Plusieurs facteurs semblent jouer un rôle déterminant dans la variation des huiles essentielles :

- **Effet de l'échantillonnage : influence de la hauteur et du diamètre des arbres récoltés.**

Dans l'ensemble, on trouve peu de corrélations significatives entre la taille des arbres et la composition chimique, voire aucune si l'on tient compte de la correction de Bonferroni. Il semble donc que la taille des arbres n'influence pas la composition chimique.

- **Les facteurs biotiques.**

- Le rôle premier des molécules contenues dans les huiles essentielles est la lutte contre les insectes et champignons pathogènes. On s'attend donc à ce que ces derniers constituent la principale pression de sélection sur la composition chimique. Ainsi la variabilité



chimique pourrait s'expliquer par l'existence de cortèges d'insectes et champignons différents selon les localités. Cette hypothèse s'est avérée trop lourde à tester sur le terrain car supposerait un inventaire précis des cortèges d'insectes présents tout au long de l'année.

- Un autre facteur biotique n'a pas pu être pris en compte dans notre analyse des déterminants potentiels de la variabilité chimique : il s'agit de l'environnement phytosociologique. En effet le Santal est un hémiparasite et l'on peut faire l'hypothèse que la nature des espèces-hôtes influence la composition de sa sève brute, et donc probablement de ses composés secondaires. Une étude serait nécessaire à ce sujet, en procédant à un inventaire complet des plantes-hôtes pour chaque arbre analysé chimiquement.

- **Les facteurs abiotiques**

- La pluviométrie n'est pas corrélée avec la composition chimique, excepté pour le pic 32 et l' $\alpha$ -santalène dont les proportions sont peu importantes dans la concrète. On peut donc conclure qu'il n'existe pas de lien direct entre la pluviométrie et la composition chimique de la concrète. D'après l'ANOVA (tableau 4.8), le type de sol, fersiallitique ou non, semble jouer un rôle. Cependant le sol fersiallitique étant présent seulement à Malhec, il est impossible de savoir si le sol est une cause directe de la particularité chimique de cette population.

- **La dérive génétique**

Diverses études ont tenté de relier la diversité chimique des huiles essentielles à la diversité génétique en utilisant des marqueurs moléculaires. Les résultats divergent selon les espèces étudiées. Pour exemples, Skoula *et al.* (1999) comparent la structuration sur les huiles de *Salvia fruticosa* obtenue par une analyse canonique discriminante avec une analyse hiérarchique par clusters menée sur les données RAPD. Ils disposent de plus d'un essai en milieu contrôlé, leur permettant de conclure à une action simultanée du génome et du micro-environnement sur l'expression des gènes. De même, Echeverrigaray *et al.* (2001) se basent sur une comparaison des matrices de distances génétique et chimique à partir d'un essai en milieu contrôlé, et montrent une concordance entre la structuration de populations de *Thymus vulgaris* sur la base de la chimie des huiles essentielles par rapport à la structuration sur la base des RAPD. Ils concluent à un fort effet génétique et à l'égale utilisation de la chimie ou la génétique pour déterminer les provenances. Shelton *et al.* (2002) utilisent les microsattellites et les huiles de *Melaleuca alternifolia*, mais disposent aussi d'un plan de croisement afin de déterminer l'importance du facteur génétique. Ils concluent qu'il existe une détermination



génétique de la composition chimique des huiles essentielles qui n'est pas détectable par l'analyse des microsattellites ou des isozymes.

Notre étude se contente donc de comparer la structuration sur les marqueurs neutres et sur la composition des huiles, afin de vérifier que les déterminants génétiques de l'huile de *Santalum austrocaledonicum* ne sont pas soumis à un simple phénomène de dérive et d'isolement par la distance. Nos diverses analyses montrent une faible corrélation entre les distances chimiques et génétiques, que ce soit via les arbres phylogénétiques ou la comparaison statistique directe des matrices de distances. L'analyse de co-inertie est quant à elle plus exploratoire sur cette comparaison chimie/génétique. L'analyse menée sur les données individuelles montre une faible corrélation entre les deux répartitions mais était prévisible du fait de la grande variation intra-population des huiles. Cette même analyse conduite au niveau des populations donne un résultat différent, avec une corrélation relativement forte ( $R=0.72$ ) mais peu significative. Compte tenu du caractère exploratoire de cette étude de co-inertie et du faible nombre de populations soumis à cette analyse, nous considérerons uniquement les résultats des autres analyses, c'est-à-dire une quasi absence de corrélation entre la structuration via les marqueurs moléculaires et celle via les huiles.

Ceci permet d'ores et déjà de conclure que l'utilisation des huiles n'est pas substituable à celle des marqueurs moléculaires neutres afin de définir une provenance. La variation chimique des huiles de *S. austrocaledonicum* est donc, vraisemblablement, comme beaucoup d'espèces, due à l'action conjointe d'un génotype soumis à la sélection et de facteurs environnementaux régulant l'expression de ce génotype. La solution la plus simple serait d'envisager des croisements en milieu contrôlé. Cependant, compte-tenu du temps de maturation d'un arbre (30 ans) cette étude est clairement inenvisageable. De très nombreuses enzymes et facteurs de régulation interviennent dans la biosynthèse des composés de la concrète et mériteraient d'être étudiés au niveau génétique, comme cela a été fait par exemple pour les monoterpènes de l'Eucalyptus (Shepherd *et al.*, 1999) via l'étude de QTL, ou par la recherche de gènes candidats. Cette perspective fait partie des prochains axes de recherche sur le Santal. Cette étude pourrait être centrée sur les molécules les plus importantes de la concrète telles que l' $\alpha$ -santalol, mais surtout sur les molécules à effet insectifuge, qui pourraient être déterminées avec des tests similaires à celui conduit au CIRAD-bois relaté en annexe 2.

**Conclusion du chapitre 4 :** Ainsi, comme l'avait souligné Boira (1998), l'impact des différents facteurs biotiques, abiotiques et génétiques, est souvent difficile à clarifier. Notre





étude nous aura permis d'étudier l'impact de 3 principaux facteurs pris indépendamment : la pluviométrie, le sol, et la dérive génétique. En réalité ces facteurs sont tous confondus et il est impossible d'identifier un facteur prépondérant parmi les autres. Des études en milieu contrôlé seraient nécessaires pour élucider l'impact de ces différents facteurs, mais il s'agit d'études à grande échelle de temps.

Cette étude est la première étude de variabilité chimique du bois de cœur sur le Santal calédonien. Une étude similaire est en cours pour la comparaison de ces données avec celles du Santal de Polynésie française. Les analyses chimiques y ont été réalisées avec un matériel de chromatographie similaire, préalablement calibré entre Polynésie et Calédonie, de sorte à rendre les résultats comparables. Les résultats de la comparaison des bois de cœur polynésiens et calédoniens devraient être connus sous peu.



## ***CHAPITRE 5***

### ***Approche méthodologique pour la conservation et la gestion de Santalum austrocaledonicum***



Ce chapitre a pour objectif de synthétiser les résultats présentés dans les précédents chapitres afin d'élaborer une stratégie de conservation de l'espèce. Cette réflexion a fait l'objet d'un article joint en annexe 4 :

- Bottin L, Tassin J, Nasi R, Bouvet JM. Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia. *Conservation Genetics*, sous presse.

Dans le chapitre qui va suivre nous ne reprendrons pas les éléments abordés dans l'article, mais nous présenterons plus en détail le contexte de conservation de *Santalum austrocaledonicum* et la théorie associée à la définition d'unités de conservation.

## **Pourquoi conserver *Santalum austrocaledonicum* ?**

*Santalum austrocaledonicum* est une espèce ayant fortement souffert de la surexploitation lors de la colonisation de la Nouvelle-Calédonie par les européens (cf. chapitre I). La Grande Terre est l'île la plus marquée par cette histoire, ses populations de Santal étant aujourd'hui de très faible taille (exceptée celle de Ouen Toro). Sur les îles Loyauté, comme sur l'île des Pins, l'exploitation a aussi été rude mais les populations possèdent des tailles beaucoup plus importantes que sur Grande Terre. Cependant, les peuplements de *Santalum austrocaledonicum* sont reconnus comme « fortement réduits » par l'institut Cropwatch (Burfield et Wildwood, 2004).

La prise de conscience de la vulnérabilité des populations de Santal a conduit, dès 1988 à la mise en place de quotas sur les coupes. Les récents inventaires (Brinkert, 2003 ; Steierer, 2004) ont permis d'évaluer l'efficacité de ces mesures de restriction sur la démographie des populations et de réactualiser les quotas d'exploitation, soit 11.5 t/an à Lifou, 7.7 t/an à Ouvéa, et 10 t/an à Maré. Les résultats montrent que les populations sont en bonne santé et en légère expansion entre ces deux dates (cf. chapitre I). Cependant ces mesures de conservation sont basées uniquement sur des résultats démographiques et nous souhaitons intégrer la prise en compte de l'aspect biologique, en particulier génétique de cette espèce.

## **Génétique de la conservation et définition d'Unités Evolutives Significatives**

La génétique de la conservation a pour objectif de diminuer le risque d'extinction d'une espèce en se référant aux facteurs génétiques (Frankham *et al.*, 2002). Il s'agit de conserver les

**Tableau 5.1** : Définition des unités de gestion à l'intérieur d'une espèce sur la base de l'échangeabilité génétique et écologique (Crandall et al. 2000). Cette méthode a été proposée pour mesurer des catégories de distinction entre populations, et les conséquences en termes de recommandations pour les actions de gestion pour chacune des catégories. Les catégories de distinction entre populations sont basées sur le rejet (R) ou d'acceptation (A) de l'hypothèse nulle d'une possibilité d'échange génétique et écologique pour à la fois leur histoire récente et ancienne. Alors que le nombre sur la partie gauche de la table augmente, il y a moins d'arguments pour étayer une différenciation significative entre populations.

Hypothèse Ho : possibilité d'échange		
Echelle de temps	Génétique	Ecologique
Récente	R ou A	R ou A
Historique	R ou A	R ou A

Force de l'argument	Argument de distinction	Action de gestion recommandée
1	$\frac{R}{R}   \frac{R}{R}$	Espèces distinctes
2	$\frac{R}{A}   \frac{R}{R}$ $\frac{R}{R}   \frac{R}{A}$	Traiter comme des espèces séparées
3	$\frac{A}{R}   \frac{R}{R}$	Traiter comme des populations différentes (mélange récent, perte de distinction génétique)
4	$\frac{R}{R}   \frac{A}{R}$	Convergence naturelle sur la possibilité d'échange écologique – à traiter comme une population unique ; ou Convergence anthropogénique – à traiter comme des populations séparées.
5	(a) $\frac{R}{A}   \frac{R}{A}$ (b) $\frac{A}{A}   \frac{R}{R}$ (c) $\frac{A}{R}   \frac{A}{R}$	(a) et (b) Distinction écologique récente, à traiter comme des populations distinctes; (c) Permettre le flux génique avec la structure de population actuelle
6	$\frac{A}{A}   \frac{R}{R}$	Permettre un flux génique avec la structure de population actuelle ; traiter comme des populations distinctes
7	$\frac{R}{R}   \frac{A}{A}$	Permettre un bon flux génique avec la structure de population actuelle ; traiter comme une population unique
8	$\frac{R}{A}   \frac{A}{A}$ $\frac{A}{A}   \frac{A}{R}$ $\frac{A}{R}   \frac{A}{A}$ $\frac{R}{A}   \frac{A}{R}$ $\frac{A}{R}   \frac{A}{A}$ $\frac{A}{A}   \frac{A}{A}$	Traiter comme une population unique ; si la possibilité d'échange est due à des effets anthropogéniques, restaurer les conditions historiques ; si due à des effets naturels, permettre le flux génique

espèces comme des entités dynamiques capables de réagir aux changements environnementaux en définissant, notamment, des unités de gestion. La préservation de la diversité génétique intra-spécifique, considérée comme l'un des trois niveaux de la biodiversité, est ainsi recommandée par l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature et des Ressources Naturelles) pour la conservation des espèces. De fait, l'évaluation de cette diversité est devenue un critère stratégique pour la gestion des espèces et le développement de plans de conservation efficaces (Newton *et al.*, 1999).

Les programmes de conservation des espèces ne permettent pas, en général, de préserver toutes les populations. L'identification de lignées évolutives, c'est-à-dire de sous-populations distinctes sur le plan génétique, chez une espèce menacée a pour objectif d'élaborer des stratégies de gestion pour une conservation optimale de la diversité génétique (Moritz et Faith, 1998). Proposé par Ryder en 1986 (dans Crandall *et al.*, 2000), le concept d'Unités Evolutives Significatives (Evolutionary Significant Units, ESU) avait pour objectif de faciliter la définition d'unités de conservation (Moritz, 1994 ; Newton *et al.*, 1999). Moritz (1994) proposa l'utilisation de marqueurs génétiques pour définir ces unités de gestion au sein d'une espèce en tenant le raisonnement suivant : si les loci nucléaires présentent une divergence significative de la fréquence des allèles, alors les populations peuvent être définies comme des ESUs distinctes, et gérées séparément.

Crandall *et al.* (2000) ont par la suite souligné le fait que cette définition des ESUs ne prenait pas en compte les différences adaptatives, et ont proposé un nouveau système d'aide à la décision classifiant les populations sur la base de l'échangeabilité sur les plans génétiques et écologiques et à des échelles de temps récentes ou anciennes. En d'autres termes, afin d'identifier des unités de gestion de manière plus pertinente, il propose de combiner des données moléculaires et adaptatives à différents niveaux temporels.

En pratique, la méthode consiste à attribuer une classification « R » ou « A » dans chacune des 4 cellules représentant les échangeabilités passées et récentes, écologiques et génétiques (tableau 5.1). Il en résulte 16 catégories de divergence entre populations.

- L'échangeabilité génétique concerne l'étendue du flux génique. Elle est acceptée (A) lorsque l'on peut prouver qu'il y a un flux de gènes important. Elle est rejetée (R) lorsqu'il existe une preuve d'un faible flux de gènes entre populations. La règle généralement admise pour déterminer qu'un flux de gènes est faible est celle du « one migrant per generation » (OMPG) (Spieth, 1974 ; Lewontin, 1974 ; Mills et Allendorf, 1995) selon laquelle le flux génétique est faible lorsque  $Nm < 1$ , où  $Nm$  est le nombre de nouveaux immigrants qui participent à la reproduction de la population à chaque génération. Cependant cette règle a été





très controversée car le modèle mathématique permettant l'estimation du  $Nm$  ( $F_{st} = 1/(4Nm+1)$ , Wright, 1931) nécessite des hypothèses biologiques ne pouvant être valables en milieu naturel : un modèle insulaire avec nombre infini de sous-populations, pas de mutations, des populations idéales de taille égale au nombre d'individus efficace, une démographie identique et des fréquences génétiques à l'équilibre dans toutes les populations (Mills et Allendorf, 1996 ; Whitlock et McCauley, 1999). Nous n'avons donc par retenu la méthode OMPG pour décrire la force du flux génétique, et nous sommes simplement fondés sur la significativité du  $F_{st}$  entre populations, témoin de la différenciation entre populations. Le flux de gènes est idéalement évalué sur de multiples loci nucléaires (allozymes, microsatellites, etc.) mais peut aussi simplement être basé sur l'ADN mitochondrial ou chloroplastique. Considérant les arbres forestiers, Newton *et al.* (1999) suggèrent que ce concept peut être appliqué quand des données chloroplastiques et nucléaires sont disponibles. Les ESU doivent alors présenter une divergence significative pour les haplotypes, et une différence significative des fréquences alléliques aux loci nucléaires.

- L'échangeabilité écologique est quant à elle fondée sur les facteurs qui définissent la niche fondamentale et le développement de nouveaux variants génétiques dus à la dérive génétique et la sélection naturelle. L'échangeabilité écologique est rejetée (R) lorsqu'il y a des preuves d'une différenciation des populations causée par la dérive génétique ou la sélection naturelle. Ces preuves peuvent être apportées par différents traits d'histoire de vie, la morphologie, l'habitat, les QTL, les loci soumis à sélection, et de telles différences devraient, idéalement, être héréditaires.
- Les échelles de temps récente et historique permettent de distinguer les processus naturels évolutifs de flux génétique limité (« R » dans la catégorie historique/génétique), de ceux liés à un isolement récent (« R » à récent/génétique). Elles permettent aussi de distinguer un contact secondaire (« A » à récent/génétique) d'un flux de gènes à long terme (« A » à historique/génétique).

Des recommandations de gestion sont proposées par Crandall pour ces 8 catégories. Cette méthodologie permet donc de donner des principes logiques pour distinguer les populations nécessitant une gestion séparée, sans avoir un nombre excessif d'unités de gestion qui ne montrent pas de différenciation adaptative. Elle permet une gestion plus pertinente et mieux adaptée que celle obtenue sur la seule définition des ESU (fondée sur les résultats d'analyses des marqueurs moléculaires neutres uniquement), terme applicable à toutes les catégories définies dans le tableau 5.1.



## Vers une stratégie de gestion du Santal calédonien

Concernant *Santalum austrocaledonicum*, nous nous sommes intéressés aux deux unités dont la singularité est ressortie dans les chapitres précédents avec l'étude des marqueurs neutres et adaptatifs: les Loyautés d'une part, Grande Terre et l'île des Pins d'autre part (annexe 5). Pour ces deux unités, on peut en effet considérer qu'il existe un flux de gènes aujourd'hui restreint (cf. chapitre II.) (« R » à récent/génétique). Ce flux de gènes a pu être plus important par le passé si les oiseaux étaient plus présents et permettaient un flux de graines entre îles plus important (« R » ou « A » à historique/génétique). Concernant les différences écologiques (sol, pluviométrie), elles sont présentes depuis la création de l'archipel (« R » à récent/écologique et historique écologique).

Nous nous trouvons donc, pour ces deux unités que nous avons prédéfinies, dans le cas (1) :

Hypothèse Ho : possibilité d'échange

Echelle de temps	Génétique	Ecologique
Récente	R	R
Historique	R	R

ou (2) :

Echelle de temps	Génétique	Ecologique
Récente	R	R
Historique	A	R

D'après le tableau V.1., le cas (1) représente le cas d'espèces différentes ou en cours de spéciation, ce qui n'est pas le cas ici. Il s'agit donc plutôt du cas (2) qui nécessite de traiter ces unités comme s'il s'agissait d'espèces différentes. Si l'on considère aussi le caractère de la variabilité chimique du bois de cœur, qui n'avait pas été pris en compte dans l'article, cette structuration est confirmée, les Loyautés ayant des compositions chimiques assez différentes de celles de Grande Terre.

A l'intérieur de ces unités, certaines populations semblent avoir des fonctionnements particuliers (cf chapitre II, III, IV), et pourraient nécessiter des mesures de conservation particulières. Nous avons donc appliqué la règle de Crandall afin de déterminer si ces populations requéraient des modes de gestion particuliers.

Sur les trois îles Loyauté, les conditions environnementales sont assez similaires (même sol, pluviométrie comparable (cf tableau 1.1), ce depuis leur création. Les flux de gènes sont aujourd'hui restreints (isolement par la distance entre ces trois îles démontré dans le chapitre II, et l'article de Bottin *et al.*, 2005a, annexe 2), et pourraient, comme dans le cas précédent,



s'être amoindris récemment du fait de la diminution des oiseaux disperseurs (cf. Chapitre 3.4.). Nous serions ainsi dans le cas suivant :

Hypothèse Ho : possibilité d'échange

Echelle de temps	Génétique	Ecologique
Récente	R	A
Historique	A	A

Ce cas, d'après la méthode de Crandall, nécessite de considérer les îles Loyauté comme une population unique, et de permettre le flux génique entre ces îles. Il est donc possible de pratiquer des échanges de graines entre ces îles.

Au niveau intra-île, nous manquons de connaissances en matière de génétique et de caractères quantitatifs, les échantillonnages étant trop limités par rapport au grand nombre d'individus. En revanche les récents inventaires (Brinkert, 2003 ; Steierer, 2004) ont permis de mettre en évidence des sous-populations intra-îles à restaurer, de par leur trop faible régénération ou leur exploitation trop importante.

A Grande Terre, les petites populations sont menacées par l'absence de régénération et l'abrutissement par les cerfs, et exigent des mesures adaptées à leur petite taille. Etant récemment fragmentées mais avec des habitats écologiques semblables (sauf pour Hienghène), elles sont plutôt, entre elles, dans le cas suivant :

Hypothèse Ho : possibilité d'échange

Echelle de temps	Génétique	Ecologique
Récente	R	A
Historique	A	A

Dans ce cas, le principe de gestion recommandé (tableau V.1., catégorie 8) est de les traiter comme des populations uniques, car la fragmentation est d'origine anthropogène, et de restaurer les conditions historiques. Les mesures pour ces populations doivent viser à étoffer les populations avec des individus de même provenance, de manière à conserver l'adaptation locale des populations et empêcher une dépression d'« outbreeding » (McKay et Latta, 2002). Le cas de Hienghène vis-à-vis des autres populations de Grande Terre est semblable à celui des Loyautés vis-à-vis de Grande Terre : la coupure du flux de gènes est récente, due à la surexploitation, et l'on peut considérer que les conditions écologiques sur la côte Est de Grande Terre sont, et ont toujours été, différentes de celles de la côte Ouest. La représentation selon Crandall des différences entre Hienghène et les populations de Grande Terre serait donc :



Hypothèse Ho : possibilité d'échange

Echelle de temps	Génétique	Ecologique
Récente	R	R
Historique	A	R

La recommandation en terme de gestion pour Hienghène serait donc de la considérer de façon isolée, comme une espèce différente. Ceci d'autant plus que les analyses chimiques ont révélé un chimiotype particulier dans cette population, pouvant représenter une adaptation aux conditions locales.

La conservation du Santal calédonien passe donc par une gestion séparée des deux unités reconnues comme très différentes sur les plans génétiques et quantitatifs : Grande Terre/île des Pins, et les Loyautés. Les populations de ces deux entités devront être considérées comme des espèces différentes. A l'intérieur de ces unités, les populations doivent être considérées séparément, et selon les cas, le flux de gènes doit être permis (aux Loyautés par exemple) ou limité à la densification des populations par des graines exogènes (dans les petites populations de Grande Terre).





## *Conclusion et perspectives*



Cette étude constitue un premier travail exploratoire sur la compréhension des déterminants de la diversité de *Santalum austrocaledonicum*, une espèce encore très peu étudiée. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif général de comprendre l'impact des forces évolutives sur la diversité de plusieurs caractères d'une espèce forestière en milieu insulaire. L'originalité de notre démarche résidait dans l'alliance d'une approche moléculaire fondée sur les marqueurs « neutres » et quantitative sur des caractères complexes susceptibles d'être soumis à la sélection. Nous allons présenter dans un premier temps les effets de l'insularité sur *Santalum austrocaledonicum* mis en évidence par notre étude, et dans un second temps nous présenterons plus en détail les conclusions liées à nos objectifs de départ et les perspectives de recherche.

### **L'évolution en milieu insulaire dans le cas de *Santalum austrocaledonicum***

Cette étude nous aura permis d'aborder plusieurs caractéristiques de l'évolution en milieu insulaire, à commencer par les forces évolutives particulières s'exerçant sur une espèce de milieu insulaire, en confirmant notamment l'exacerbation de la dérive au sein des petites îles. Toutefois, la dérive est-elle le moteur évolutif principal de l'évolution génétique en Nouvelle-Calédonie? La synthèse de Nevo (2001) établit que l'évolution de la biodiversité, même dans les petites populations, est sous l'action prédominante de la sélection naturelle. Les effets de mutation, migration et dérive peuvent interagir avec la sélection, mais restent moins influents que cette dernière sur l'évolution des espèces. Notre étude pose la question de l'effet non négligeable de la sélection sur des caractères phénotypiques et chimiques du Santal calédonien, cependant elle ne permet pas de quantifier - faute d'un échantillonnage suffisant ou de conditions écologiques (cortège d'insectes) suffisamment précises - les puissances respectives des forces de sélection et de dérive. Cette question constitue un des principaux axes de recherche à aborder par la suite.

Notre étude nous aura aussi permis d'approcher la question des particularités évolutives des espèces insulaires, notamment celles liées au régime de reproduction. Barrett (1996) souligne notamment que le déficit en insectes pollinisateurs sur les îles comparativement aux continents peut influencer les stratégies de reproduction (voir introduction). C'est ce que nous avons constaté avec Maré dont le déficit en hétérozygotes a été attribué à une forte



autofécondation, qui serait due à un manque d'insectes pollinisateurs. Cette hypothèse reste à tester comme nous le verrons par la suite, mais tendrait à confirmer l'existence de stratégies de reproduction particulières liées à la petite taille des îles, leur isolement et donc leur cortège faunistique spécifique. De même, la clonalité, mode de reproduction effectué par le Santal via le drageonnage et reconnue comme étant une stratégie de survie après les feux de brousses ou l'exploitation anthropique, pourrait aussi être une stratégie de colonisation pour le Santal dans les zones possédant un manque de pollinisateurs.

Enfin l'isolement des îles crée des systèmes favorisant la spéciation. Deux types de spéciation allopatrique caractérisent les espèces insulaires :

- la spéciation vicariante : une barrière géographique (rivière, montagne, vallée, océan, glacier...) coupe l'aire de répartition d'une espèce en plusieurs zones. Dans chacune des zones, chaque population évolue indépendamment des autres, pouvant donner naissance à une nouvelle espèce.
- La spéciation péripatrique ou spéciation par effet fondateur : un petit nombre d'individus fonde une nouvelle population en marge de l'aire de répartition de l'espèce d'origine, par exemple suite à la colonisation d'une île près de la côte. Cette nouvelle population de petite taille peut évoluer rapidement en une nouvelle espèce.

Pour *Santalum austrocaledonicum*, fortement lié à *Santalum obtusifolium* d'Australie d'après les résultats phylogénétiques, nous ignorons la spéciation s'est déroulée par vicariance, autrement dit si le Santal était déjà présent sur la partie « calédonienne » du Gondwana avant sa séparation, ou si la colonisation de la Nouvelle-Calédonie s'est réalisée après l'isolement géographique de la Nouvelle-Calédonie. Cette question sera élucidée en connaissant le moment de divergence des espèces australienne et calédonienne.

L'isolement par la distance des îles au sein de l'archipel calédonien, particulièrement les Loyautés vis-à-vis de Grande Terre, laisse supposer qu'un processus de spéciation péripatrique pourrait avoir lieu. En particulier, si la diminution des guildes d'oiseaux dans les îles reportée par Mc Conkey et al. (2002) se poursuit, la diminution des flux par graines risque d'accentuer les différences génétiques entre les îles.

Ces trois grandes questions évolutives pourront être abordées par de nouvelles recherches que nous allons maintenant décrire en les remplaçant par rapport à nos objectifs initiaux.



## Réponse aux objectifs et perspectives de recherche

- Le premier objectif était de comprendre quels étaient les effets de la dérive et de la migration sur la diversité génétique dans l'archipel. Cet aspect a été abordé par l'étude de la variabilité des microsatellites nucléaires et chloroplastiques - marqueurs neutres non soumis à la sélection - d'individus répartis dans l'ensemble de l'archipel. Cette analyse nous aura permis de confirmer l'impact de la dérive génétique en milieu insulaire, c'est-à-dire une exacerbation de la différenciation génétique entre îles due à l'isolement géographique et aux barrières aux flux de gènes que constituent les océans. La dérive génétique s'est aussi révélée comme étant une force évolutive majeure dans les petites populations isolées de Grande Terre, prouvant l'impact de la fragmentation forestière sur l'évolution de la diversité génétique des populations.

Cette étude nous aura permis en outre d'inférer un scénario de colonisation de l'archipel calédonien dans lequel le Santal aurait d'abord colonisé Grande Terre et l'île des Pins, puis dans un second temps les îles Loyauté (avec une possible origine australienne comme le suggère la phylogéographie), mais seul un échantillonnage plus complet pourrait nous permettre de confirmer cette hypothèse. Il serait notamment pertinent de prospecter la côte Est de Grande Terre afin d'y trouver de nouvelles populations. Leur analyse nous permettrait de valider ou récuser l'hypothèse selon laquelle les populations de Santal de la côte Est de Grande Terre ont joué le rôle d'intermédiaires entre celles de la côte Ouest et celles des îles Loyauté.

Dans le même ordre d'idées, il serait intéressant d'avoir une meilleure connaissance des relations phylogénétiques de *Santalum austrocaledonicum* avec d'autres espèces de Santal, en particulier celle du Vanuatu, reconnue aussi comme «*S. austrocaledonicum*» mais sur laquelle quelques doutes sont émis (cf chapitre 1). En effet, notre étude nous a permis de constater que la dérive avait eu un fort impact sur la diversité génétique du Santal dans l'archipel calédonien. Le Vanuatu étant un archipel constitué de petites îles situées à plus de 500 km à l'Est des Loyautés, il est fort probable que la dérive y ait opéré dans la même mesure qu'en Calédonie, et que l'espèce présente soit différente ou en voie de spéciation. De plus, il reste à établir l'origine précise du Santal calédonien. Est-il un vestige de la flore





gondwanienne ou a-t-il colonisé la Nouvelle-Calédonie après la séparation entre cette dernière et l'Australie ?

L'exploration de la diversité des microsatellites nous aura aussi permis de mettre en évidence des îles avec des caractéristiques particulières, notamment Maré dont la diversité est étonnamment faible et l'écart à la structure de Hardy Weinberg très fort ( $F_{is}=0.62^{***}$ ). Parmi les nombreuses hypothèses sur l'origine de ces particularités, nous avons retenu celle d'un régime de reproduction spécifique fondé principalement sur l'autofécondation. Cette hypothèse reste à tester. Il pourrait être intéressant d'augmenter le nombre de loci analysés pour cette île en particulier, afin de s'affranchir des problèmes d'analyses liés à son grand nombre de loci monomorphes. Cette possibilité permettrait entre autre de tester l'existence d'un goulot d'étranglement ou d'une expansion récente dans cette île, conduisant ainsi à étoffer le scénario ayant conduit à son faible nombre d'hétérozygotes.

Si la distribution de la diversité entre populations apparaît plus clairement après notre étude, celle au sein des populations reste à explorer, et doit constituer un objectif majeur dans les recherches à venir. Il serait notamment intéressant de connaître le régime de reproduction intra-population, les distances de dissémination et de dispersion (flux de gènes), et la proportion de drageonnage effectuée par les individus au sein des populations. Une étude est en cours sur le régime de reproduction du Santal dans la population de Ouen Toro et devrait permettre d'apporter un éclairage sur ces questions, dans le cas précis de cette population (cf chapitre II), mais il serait souhaitable de le conduire dans d'autres populations, en particulier à Maré.

Les études intra-population ou du moins intra-îles pourraient aussi avoir des implications en terme de compréhension du fonctionnement démographique des populations. En effet, les récents inventaires sur les îles Loyauté (Brinkert, 2003 ; Steirer, 2004) ont mis en évidence des différences démographiques entre localités à l'intérieur des îles. En particulier, il ressort qu'à certains emplacements la régénération est forte, et la répartition des classes équilibrée, alors qu'à d'autres la régénération est insuffisante par rapport à la densité des autres classes de diamètre pour assurer un renouvellement des populations (cf. chapitre 1). Il serait intéressant dans un premier temps de détecter si ces inégalités sont liées à des différences environnementales, en faisant une description écologique précise des zones étudiées. Il est possible en effet que les zones de faible régénération proposent, depuis peu, un



environnement hostile à la régénération, soit à cause de perturbations telles que l'abroustissement par les chèvres ou le piétinement humain, soit par l'invasion d'une espèce compétitrice, ou la disparition d'espèces-hôtes, soit par le déplacement des disséminateurs (oiseaux) dans d'autres zones, soit par la fermeture du milieu, rendant l'installation du Santal difficile. Inversement, les terrains où la régénération est forte peuvent avoir été récemment ouverts par le biais de pratiques culturelles par exemple, ou avoir reçu des apports de graines par l'homme, ou par des oiseaux qui se seraient multipliés dans ces localités. Pour guider les réponses à ces questions, l'analyse génétique serait une aide précieuse. En particulier, l'étude de la diversité génétique des juvéniles pourrait permettre de savoir si les populations ont connu une expansion (ou diminution) récente, et de connaître les origines géographiques de juvéniles en comparant leurs génotypes à ceux adultes de l'île. Cette étude permettrait ainsi de retracer les mouvements récents de graines intra-île et de fournir des explications à la dynamique démographique variable selon les localités et les milieux.

- Le second objectif de notre étude était d'appréhender quelles forces évolutives pouvaient agir sur la diversité phénotypique.

Ø Nous avons pour cela considéré dans un premier temps les caractères phénotypiques que sont la taille des feuilles juvéniles et des graines, fortement liés à la fitness des espèces végétales. Ceux-ci apparaissent comme affectés à la fois par la dérive génétique et par la force sélective exercée par le gradient de pluviométrie dans l'archipel. Toutefois cette étude reste assez lacunaire du fait de la faiblesse de l'échantillonnage et du manque de connaissance du nombre d'arbres-mères dans certaines populations. L'échantillonnage est en train d'être complété, mais les récoltes de graines sont rendues difficiles par l'imprévisibilité des périodes de fructification et les dégâts causés par les cyclones ou les rats. Il serait intéressant de conduire un nouvel essai contrôlé avec davantage de provenances de graines, notamment celles de Hienghène qui est la seule population connue de la côte Est de Grande Terre. Un tel essai permettrait de s'affranchir des facteurs abiotiques pour mesurer avec plus de précision l'héritabilité des caractères concernés.

Une approche génomique des caractères de la taille des fruits et des feuilles dans un système de gradient pluviométrique serait intéressante à mener dans l'optique d'identifier l'origine de leur variabilité. Les gènes codant pour ces caractères pourraient être suivis par un marquage génétique à l'aide d'EST (Expressed Sequence Tags), marqueurs de séquences exprimées,



issus du séquençage systématique des extrémités d'ADNc et par la détection de SNP (Single Nucleotide Polymorphism), marqueurs n'ayant pas d'implication fonctionnelle mais définissant un locus unique dans le génome et polymorphes. Néanmoins, comme nous avons pu le constater dans notre étude, la dérive joue un rôle très important dans le façonnement de la diversité génétique au sein de l'archipel, compliquant l'étude des caractères adaptatifs. En effet il n'est pas possible de délimiter clairement l'impact de cette dernière de celui de la sélection. La question de la pertinence des études de caractères phénotypiques au niveau génomique est donc très délicate dans notre cas, nécessitant un important échantillonnage d'individus et de loci et de nombreux tests statistiques.

Une autre perspective intéressante dans le domaine de l'étude des caractères adaptatifs serait de comparer leur diversité au niveau plus fin des écosystèmes. En effet l'une des caractéristiques de la Nouvelle-Calédonie est sa grande richesse en écosystèmes pouvant abriter du Santal : forêt sèche, humide, ou dégradée, jachères, plages, etc. La Grande Terre, comme les îles Loyauté, constituent de véritables patchwork d'écosystèmes, et leur fonctionnement mériterait d'être appréhendé par l'intermédiaire des forces sélectives qu'ils exercent sur le génome de *Santalum austrocaledonicum*. Il pourrait être intéressant, par exemple, d'étudier la variation adaptative liée aux différences de pluviométrie au sein d'une île. Les isohyètes (figure I.5) montrent en effet qu'il existe des gradients continus de pluviométrie au sein d'îles telles que Maré ou Lifou. Un échantillonnage de graines prélevé le long de ce gradient, et planté en milieu contrôlé permettrait de connaître l'impact de la pluviométrie sur la variabilité phénotypique.

Ø Dans un second temps, nous avons étudié un caractère phénotypique original : la composition chimique de la concrète du bois de cœur de Santal. Cette étude présente un intérêt fondamental à la fois dans le domaine chimique car la composition de cette espèce était encore très peu connue, mais aussi dans la compréhension des mécanismes de défense chimique des plantes. Enfin elle présente un intérêt économique car l'huile essentielle extraite du bois de cœur de Santal est utilisée en parfumerie, l'exploitation de cet arbre assurant donc des revenus aux populations locales. De cette approche il ressort que la composition du Santal calédonien est différente de celles d'autres espèces comme celles d'Australie ou de Polynésie. La variation dans l'archipel ne semble pas être due seulement au phénomène de dérive liée à l'insularité et la fragmentation du paysage. Il semble aussi que ce caractère soit soumis à sélection, mais la corrélation avec les facteurs abiotiques n'a pas été concluante. Il s'agirait



plus probablement d'une sélection directement liée au rôle protecteur des huiles essentielles vis-à-vis des insectes et champignons phytophages, autrement dit une sélection liée à un cortège différent de phytophages selon les localités. Cette hypothèse est très difficile à évaluer de par les connaissances entomologiques insuffisantes dans l'archipel calédonien. D'autres perspectives seraient en revanche plus intéressantes à creuser. D'un point de vue chimique, il faudrait évaluer quelles sont les molécules précises de l'huile essentielle de Santal ayant un effet répulsif sur les insectes. Une fois ces molécules isolées, leur variation entre et au sein des populations serait à analyser, ainsi que leurs chaînes de biosynthèse, qui permettraient de guider les recherches sur les gènes impliqués dans la synthèse de ces molécules. Cependant cette étude de marqueurs génomiques serait plus pertinente si nous connaissions l'existence d'un gradient de pression entomologique afin de connaître la mesure dans laquelle cette pression intervient au niveau génomique.

- Notre dernier objectif, plus opérationnel, était d'associer les différentes approches, c'est-à-dire celle par les marqueurs génétiques neutres, et celle par les caractères quantitatifs, pour élaborer une stratégie de conservation de l'espèce. La conclusion de cette étude est la recommandation de considérer deux entités de conservation : celle de la côte Ouest de Grande Terre et l'île des Pins et celle des Loyautés. Ces deux entités diffèrent par la géographie, l'origine géologique, les types d'écosystèmes, et la taille des populations de Santal. Il en résulte des forces évolutives de nature différente donc des populations ayant évolué de manière dissemblable. L'adaptation actuelle aux conditions environnementales et les particularités génétiques des individus suggèrent de ne pas mélanger les individus de ces deux unités. En revanche à l'intérieur de ces unités de tels mélanges sont possibles, particulièrement sur Grande Terre où la faible taille de certaines populations les menace d'une extinction rapide sans l'intervention de l'homme par un reboisement exogène.

Les études de conservation considèrent souvent un seul pan de la diversité d'une espèce. Notre étude présentait l'originalité d'associer des caractères neutres et sélectionnés pour déterminer des zones de conservation de cette espèce en voie de raréfaction.

Les perspectives d'études restent donc nombreuses après cette première approche. Des travaux sont encore à mener pour comprendre notamment les forces agissant sur la diversité génétique des caractères phénotypiques responsables de la survie et de la reproduction de cette espèce particulièrement menacée.





## *Bibliographie*

Aberchane M, Fechtal M, Chaouch A (2004) Analysis of Moroccan Atlas Cedarwood Oil (*Cedrus atlantica* Manetti). *Journal of Essential Oil Research*, **16**(6), 542-547.

Acker F (1996) Evolution on islands. A briefing document prepared for the Royal Society and Association of British Science Writers.

[http://www.absw.org.uk/Briefings/Evolution\\_on\\_islands.htm](http://www.absw.org.uk/Briefings/Evolution_on_islands.htm)

Adams DR, Bhatnagar SP, Cookson RC (1975) *Phytochemistry*, **14**, 1459.

Addinsoft (2005) XLSTAT version 7.5.2. <http://www.xlstat.com>

Alcantara JM, Rey PJ (2003) Conflicting selection pressures on seed size: evolutionary ecology of fruit size in a bird-dispersed tree, *Olea europaea*. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 1168-1176.

Aldrich PR, Hamrick JL, Chavarriaga P, Kochert G (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, **7**, 933-944.

Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveaux sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique.

Alpha T, Raharivelomanana P, Bianchini JP, Faure R, Cambon A (1997a) Bisabolane sesquiterpenoids from *Santalum austrocaledonicum*. *Phytochemistry*, **44** (8), 1519.

Alpha T, Raharivelomanana P, Bianchini JP, Faure R., Cambon A (1997b) Identification de deux nouveaux dérivés dihydroxylés du bisabolane à partir de santal océanien. *Revista Italiana EPPOS*, Numero Speciale Gennaio, **84**.

Alpha T, Raharivelomanana P, Bianchini JP, Faure R., Cambon A (1997c) Etude de la composition chimique d'essences de santal d'origine du Pacifique Sud. Actes des 16<sup>èmes</sup> Journées Internationales des Huiles Essentielles, Digne les Bains, Septembre.

Amiot J (2005a) *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse de Doctorat en Biologie des Populations et Ecologie, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, Montpellier, 136p.

Amiot J, Salmon Y, Collin C, Thompson JD (2005b) Differential resistance to freezing and spatial distribution in a chemically polymorphic plant *Thymus vulgaris*. *Ecology Letters*, **8** (4), 370-377.

Andrianoelina O, Rakotondraoelina H, Ramamonjisoa L, Danthu P, Bouvet JM (2005) Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae), an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodiversity and Conservation*, in press.

Aubréville A (1973) Déclin des genres de conifères tropicaux dans le temps et l'espace. *Adansonia*, **13** (1), 5-35.

Baradat P, Michelozzi M, Tognetti R, Khouja ML (1995) Geographical variation in the terpene composition of *Pinus halepensis* Mill. In: *Population genetics and genetic conservation of forest*

*trees* (ed. P.H. Baradat, W.T. Adams and G. Müller-Starck), pp. 141–158. SPB Academic Publishing, Amsterdam.

Barber CA (1906). Studies in root-parasitism. The haustorium of *Santalum album*. I. Early stages, up to penetration. *Memoirs of the Department of Agriculture in India, Botanical Series*, **1** (1), 1-30.

Barber CA (1907) Studies in root-parasitism. The haustorium of *Santalum album*. II. The structure of the mature haustorium and the interrelations between host and parasite. *Memoirs of the Department of Agriculture in India, Botanical Series*, **2** (1), 1-58.

Barrett SCH (1996) The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society Ser. B.*, **351**, 725-733

Baser KHC, Ozek T, Kirimer N, Tumen G (1993) The occurrence of three chemotypes of *Thymus longicaulis* C. Presl., subsp. *longicaulis* in the same population. *Journal of Essential Oil Research*, **5** (3), 291–295.

Bazzaz FA, Chiariello NR, Coley PD, Pitelka LF (1987) Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience*, **37**, 58-67.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2001) *GENETIX 4.03, logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bianchini JP, Bouvet JM, Butaud J-F, Raharivelomanana P, Verhaegen D, Baron V (2003) Caractérisation du santal des îles Marquises, Rapport final, Projet de Recherche du Ministère d'Outre Mer. 117 pp.

Blondel J (1995) *Biogéographie Approche écologique et évolutive*. Masson, Paris, 1995. Collection Écologie.

Boira H, Blanquer A (1998) Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. - the adaptative value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26** (8), 811-822 (12).

Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A, Bouvet JM (2005a) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular Ecology*, **14** (7), 1979-1989.

Bottin L, Vaillant A, Sire P, Cardi C, Bouvet J M (2005b) “Isolation and Characterization of microsatellite loci in *Santalum austrocaledonicum*, Santalaceae”, *Molecular Ecology Notes*, **5**(4), 800-802.

Bottin L, Tassin J, Nasi R, Bouvet JM (2006) Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia. *Conservation Genetics*, in press.

Brack C (1997) Tree Growth and increment. [http://online.anu.edu.au/Forestry/mensuration/T\\_GROWTH.HTM](http://online.anu.edu.au/Forestry/mensuration/T_GROWTH.HTM)

- Brinkert M (2003) Inventaire des populations de Santal (*Santalum austrocaledonicum*) sur l'île de Maré, Nouvelle-Calédonie. Stage de fin d'étude FIF- ENGREF.
- Brophy JJ, Doran JC (2004) Geographic variation in oil characteristics of *Melaleuca ericifolia*. *Journal of Essential Oil Research*. in press
- Bryan GJ, Mc Nicoll JW, Meyer RC, Ramsay G, De Jong WS (1999) Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 859-867.
- Bryant JP, Chapin FSIII, Klein DR (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, **40**, 357-368.
- Bryant JP, Provenza FD, Pastor J, Reichardt PB, Clausen TP, Du Toit JT (1991) Interactions between woody plants and browsing mammals mediated by secondary metabolites. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **22**, 431-446.
- Burfield T, Wildwood C (2004) <http://www.cropwatch.org/cropwatch5.htm>
- Butaud JF, Raharivelomanana P, Bianchini JP, Baron V (2003) A new chemotype of sandalwood (*Santalum insulare* Bertero ex A. DC.) from Marquesas Islands, *Journal of Essential Oil Research*, **15** (5), 323-326.
- Butaud, J.F., Rives, F., Verhaegen, D. & Bouvet, J-M, (2005) Phylogeography of Eastern Polynesian sandalwood (*Santalum insulare*), an endangered tree species from the Pacific: a study based on chloroplast microsatellites. *Journal of Biogeography*, **32**, 1763-1774.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y (1993) Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, **52**, 922-927.
- Carlquist S (1980) *Hawaiï: a Natural History. Geology, Climate, Native Flora and Fauna above the Shoreline*. 2<sup>nd</sup> edn. Pacific Tropical Botanical Garden, Lawa'i Hawa'i.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution*, **32**, 550-570.
- Chessel D, Dufour AB, Dray S, avec les contributions de Lobry JR, Ollier S, Pavoine S, Thioulouse J (2005) ade4 : Analysis of Environmental Data : Exploratory and Euclidean method. Téléchargeable sur <http://pbil.univ-lyon1.fr/R/rplus/ade4dsRF.html>.
- Chessel D, Mercier P (1993) Couplage de triplets statistiques et liaisons espèces-environnement. In : *Biométrie et Environnement* (ed. J.D. Lebreton and B. Asselain), pp. 15-44. Masson, Paris.
- Chourasia OP, Nigam SS (1978) *Ind. Perfumer*, **XXII**, 205, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique
- Christenson PA, Secord N, Willis BJ (1981) *Phytochemistry*, **20**, 1139, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique.

- Clarke PJ (2002) Habitat islands in fire-prone vegetation: do landscape features influence community composition? *Journal of Biogeography*, **29**, 677-684.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 349-356.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD (2003) Evidence for multiple lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequence and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology*, **12**, 105-115.
- Coley PD, Bryant JP, Chapin FSIII (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 489-511.
- Compton SG, Newsome D, Jones DA (1983) Selection for cyanogenesis in the leaves and petals of *Lotus corniculatus* L. at high latitudes. *Oecologia*, **60**, 353-358.
- Conde MF, Pring DR, Levings CS (1979) Maternal inheritance of organelle dans in *Zea mays-Zea perennis* reciprocal crosses. *Journal of Heredity*, **70**, 2-4.
- Cordell S, Goldstein G, Muellerdombois D, Webb D, Vitousek PM (1998) Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient – the role of phenotypic plasticity. *Oecologia*, **113**, 188-196.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Cox PA, Elmquist T, Pierson ED, Rainey WE (1991) Flying foxes as strong interactors in South Pacific islands ecosystems: a conservation hypothesis. *Conservation Biology*, **5**, 448-454.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 290-295.
- Croteau R., Burbott AJ, Loomis WD (1972) Apparent energy deficiency in mono-terpene and sesqui-terpene biosynthesis in peppermint. *Phytochemistry*, **11**, 2937.
- Cunningham SA, Summerhayes B, Westoby M (1999) Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry, comparing rainfall and soil nutrient gradients. *Ecological Monographs*, **69**, 569-588.
- Dabbah R., Edwards V, Moats WA (1970) Antimicrobial action of some *Citrus* fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied Microbiology*, **19**, 27-31.
- Daday H (1954a) Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens*. 1. Distribution by latitude. *Heredity*, **8**, 61-78.
- Daday H (1954b) Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens*. 2. Distribution by altitude. *Heredity*, **8**, 377-384.
- Deguilloux MF, Pemonge MH, Petit RJ (2004) Use of chloroplast microsatellites to differentiate oak populations. *Annals of Forest Science*, **61**, 825-830.

De Laubenfels JD (1972) Gymnospermes. Flore de la Nouvelle-Calédonie et dépendances. Vol. 4, MNHN, Paris.

Demesure B, Sodzi N, Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**, 129–131.

Demole E, Demole C, Enggist P (1976) *Helv. Chim. Acta*, **59**, 737, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique

Dikshit A, Husain A (1984) *Fioterapia*, **55**, 171, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique

Dirzo R, Harper JL (1982a) Experimental studies on slug-plant interactions. III. Differences in the acceptability of individual plants of *Trifolium repens* to slugs and snails. *Journal of Ecology*, **70**, 101–118.

Dirzo R, Harper JL (1982b) Experimental studies on slug-plant interactions. III. The performance of cyanogenic and acyanogenic plants of *Trifolium repens* in the field. *Journal of Ecology*, **70**, 119–138.

Dolédec S, Chessel D (1994) Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology*, **31**, 277-294.

Drake D, Mulder CPH, Tows DR, Daugherty CH (2002) The biology of insularity, an introduction. *Journal of Biogeography*, **29**, 563-569.

Dutech C, Joly HI, Jarne P (2004) Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guiana populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. *Heredity*, **92**, 69-77.

Dwivedi C, Guan X, Harmsen WL, Voss AL, Goetz-Parten DE, Koopman EM, Johnson KM, Valluri HB, Matthees DP (2003) Chemopreventive Effects of  $\alpha$ -santalol on Skin Tumor Development in CD-1 and SENCAR Mice. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, **12**, 151-156.

Dwivedi C, Valluri HB, Guan X, Agarwal R (2005) Chemopreventive effects of  $\alpha$ -santalol on UVB-induced skin cancer development, *Cancer Letter*, submitted.

Echeverrigaray S, Agostini G, Atti-Serfini L, Paroul N, Pauletti GF, Atti Dos Santos AC (2001) Correlation between the Chemical and Genetic Relationships among Commercial Thyme Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4220-4223.

Ehrhart Y, Raharivelomanana P (1998) Oil composition of the sandalwood (*Santalum austrocaledonicum*) from Erromango and Aniwa islands, Vanuatu. A report for CIRAD-Forêt, Nouvelle-Calédonie. Unpublished.

Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, **18**, 586-608.

- Ellis WM, Keymer RJ, Jones DA (1977) The defensive function of cyanogenesis in natural populations. *Experientia*, **33**, 309.
- England P, Phillip R, Usher, Annette V, Whelan, Robert J, Ayre, David J (2002) Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. *Molecular Ecology*, **11**, 967–977.
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259.
- Erhart Y (1996) Manuel d'utilisation du Santal en pépinière. CIRAD-forêt Nouvelle-Calédonie. 21p.
- Escoufier Y (1973) Le traitement des variables vectorielles. *Biometrics*, **29**, 750-760.
- Espirat JJ, Géologie de la Nouvelle-Calédonie, <http://www.brousse-en-folie.com/broussefolie/nc/geol.php>
- Falconer DS, Mc Kay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*. Longman Sci and Tech, Harlow, United Kingdom.
- Feeny PP (1976) Plant apparency and chemical defense. In: *Biochemical interactions between plants and insects*. (ed. Wallace J and Mansell RL), pp. 1-40. Plenum Press, New-York.
- Felsenstein J (1993) *PHYLIP*: Phylogenetic inference package, Version 3.573c. University of Washington, Seattle, WA.
- Fitter AH, Hay RKM (2002) *Environmental physiology of plants*, 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Fluckiger FA, Hanbury D (1879) *Pharmacographia. History of the principal drug of vegetable origin met in Great Britain and British India*. (ed. Mc. Milan and co). London, 599.
- Fonseca CR, Overton JM, Collins B, Westoby M (2000) Shifts in trait-combinations along rainfall and phosphorus gradients. *Journal of Ecology*, **88**, 964-977.
- Fontaine C, Lovett PN, Sanou H, Maley J, Bouvet JM (2004) Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*, **93**, 639-648.
- Fraenkel GS (1959). The *raison d'être* of secondary plant substances. *Science*, **129**, 1460-1470.
- Frankel OH (1983) The management in conservation. In *Genetics and Conservation: a reference for Managing Wild Animals and Plant Populations*. (ed. C.M. Schonewald-Cox, SM Chambers, B MacBryde and L Thomas), pp. 1-14. Benjamin / Cummings, Menlo Park, CA, USA.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Freeland WJ, Janzen DH (1974) Strategies in herbivory by mammals - role of plant secondary compounds. *The American Naturalist*, **108**, 269-289.



Futuyama DJ, Keese MC (1992) Evolution and coevolution of plants and phytophagous arthropods. In: *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites* (ed. G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum), pp. 439-475. Academic Press, San Diego.

Garnéro J (1987) *Quintessenza (Curt Georgi Imes)*, **3** (9), 5, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique

Garnier E (1992) Growth analysis of congeneric annual and perennial grass species. *Journal of Ecology*, **13**, 665–675.

Gibbs D, Barnes E, Cox J (2001) *Pigeons and doves. A guide to the pigeons and doves of the world*, Pica press, Sussex.

Gillespie RG (2002) Biogeography of spiders on remote oceanic islands of the Pacific: archipelagos as stepping stones? *Journal of Biogeography*, **29**, 655-662.

Gomez A, Gonzalez-Martinez SC, Collada C, Climent J, Gill L (2003) Complex population genetic structure in the endemic Canary Island pine revealed using chloroplast microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 1123-1131.

Good R (1964) *The geography of flowering plants*. Longman, London.

Grandieu-Burtin P (1999) Origine biochimique de la couleur du bois de noyer (*juglans* sp.). Thèse, science du bois, Nancy I, pp. 257

Griffiths JR (1971) Reconstruction of the South-West Pacific margin of Gondwanaland. *Nature*, **234**, 203-207.

Grivet D, Petit RJ (2003) Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conservation Genetics*, **4**, 47-56.

Guillaumin A (1928) Les régions florales du pacifique d'après leur endémisme et la répartition de quelques plantes phanérogames. *Proceedings of the 3rd Pan-Pacific Science Congress*, Tokyo, **1**, 920-938.

Guillot G, Mortier F, Estoup A (2005) Geneland : A program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 712-715.

Hallé N (1972) *Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances* (Muséum National d'Histoire Naturelle), **15**, 104.

Hallé N (1988) Santalaceae. In: *Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances*. (ed. J. Jeremie, D.J. Mabberley, Ph. Morat, J.M. Veillon, and N. Hallé), pp 99-152. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

Hamilton JG, Zangerl AL, DeLucia EH, Berenbaum MR (2001). The carbon-nutrient hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters*, **4**, 86-95.

- Hamrick JL, Godt MJ, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, **6**, 95-124.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society Ser. B.*, **351**, 1291–1298.
- Hamrick JL, Murawski DA (1990) The breeding structure of tropical populations. *Plant Species Biology*, **5**, 157-165.
- Hamrick JL, Nason JD (2000) *Gene Flow in Forest Trees, Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. (ed A. Young, D. Boshier, and T. Boyle), pp. 1-3. New York, USA.
- Hardy GH (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, **28**, 49-50.
- Hermes DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, **67**, 283-335.
- Holzapfel AS, Faville M, Gemmill CEC (2002) Genetic variation of the endangered holoparasite *Dactylanthus taylorii*. (Balanophoraceae) in New Zealand. *Journal of Biogeography*, **29**, 663-676.
- Hovenden MJ, Vander Schoor JK (2004) Nature vs nurture in the leaf morphology of Southern beech, *Nothofagus cunninghamii* (Nothofagaceae). *New Phytologist*, **161** (2), 585-594.
- Hughes MA (1991) The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity*, **66**, 105–115.
- Ireland BF, Hibbert DB, Goldsack RJ, Doran JC (2002) Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (2002) *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**, 457-470.
- Ishii T, Mori N, Ogihara Y (2001) Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**, 896-904.
- Jain SH, Angadi VG, Rajeevalochan AN, Shankaranarayana KH, Theagarajan KS, Rangaswamy CR (1998) Identification of provenances of sandal in India for genetic conservation. *ACIAR Proceedings*, **84**, 117-120.
- Jain SH, Angadi VG, Shankaranarayana KH, Ravikumar G (2003) Relationship between Girth and percentage of oil in trees of sandal (*Santalum album* L.) provenances. *Sandalwood Research Newsletter*, **18**, 4-5.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, **11** (10), 424-429.
- Jayappa V, Nataraj BM, Shanbhag PK, Patil KB, Srinvas A (1981) *Pafai Journal*, **3**, 27-30.
- Jones DA (1973) Co-evolution and cyanogenesis. In: *Taxonomy and Ecology* (ed. V.H. Heywood), pp. 213–242. Academic Press, London.

- Jordano P (2000) Angiosperm fleshy fruits and seed dispersers – a comparative analysis of adaptation and constraints in plant-animal interactions. *The American Naturalist*, **145**, 163-191.
- Kelly B, Hardy O, Bouvet JM (2004) Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular Ecology*, **13** (5), 1231-1240.
- Khurana E, Singh JS (2001) Ecology of tree seed and seedlings: implications for tropical forest conservation and restoration. *Current Science*, **80**, 748-757.
- King RA, Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology*, **7**, 1151-1161.
- Latta RG (1998) Differentiation of allelic frequencies at quantitative trait loci affecting locally adaptive traits. *The American Naturalist*, **151**, 283-292.
- Le Bourdieu P, Jost C, Angleviel F (1996) Géo-Pacifique des espaces français. - 228 p. Publié à l'occasion des journées géographiques tenues en Polynésie française, en Nouvelle-Calédonie et à Wallis et Futuna du 2 au 20 mai 1994.
- Lebot V, Levesque J (1996) Genetic control of kavalactone chemotypes in *Piper methysticum* cultivars. *Phytochemistry*, **43** (2), 397–403.
- Lemes MR, Gribel R, Proctor J, Grattapaglia D, (2003). Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, *Meliaceae*) across the Brazilian Amazon based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, **12**, 2845-2883
- Levin DA (1976) The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **7**, 121-159.
- Lewontin RC (1974) *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press, New York.
- Lhuillier E (2005) Diversité génétique de *Santalum insulare*, espèce forestière de Polynésie Française. Implications pour sa conservation. Mémoire de Master Pro II Parcours Génétique et Gestion de la Biodiversité, Université Pierre et Marie Curie.
- Linhart YB, Thompson JD (1995) Terpene-based selective herbivory by *Helix aspera* on *Thymus vulgaris*. *Oecologia*, **102**, 126–132.
- Linhart YB, Thompson JD (1999) Thyme is of the essence: biochemical polymorphism and multi-species deterrence. *Evolutionary and Ecology Research*, **1**, 151–171.
- Lomolino MV (2000) A call for a new paradigm of island biogeography. *Global Ecology and Biogeography*, **9**, 1-6.
- Lord JM (2004) Frugivore gape size and the evolution of fruit size and shape in southern hemisphere floras. *Austral Ecology*, **29**, 430-436.
- Luikart G, Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, **12**, 228-237.

- Lynch M, Spitze K (1994) Evolutionary genetics of *Daphnia*. In: *Ecological Genetics* (ed. L.A. Real), pp. 86-108. Princeton University Press, Princeton.
- Magel EA (2000) *Biochemistry and physiology of heartwood formation in Cell & Molecular Biology of Wood Formation*. (ed. R Savidge, J Barnett and R Napier). BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Malfei M, Mucciarelli M, Scannerini S (1993) Environmental factors affecting the lipid metabolism in *Rosmarinus officinalis* L. *Biochemistry and Systematic Ecology*, **21** (8), 765–794.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, **27**, 209-220.
- MapInfo Professional® 7.8, Claritas. <http://intercarto.com/html/fr/sls/claritas/mapinfo.php>
- Marshall HD, Newton C, Ritland K (2002) Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 367-378.
- Mc Conkey K, Drake DR (2002) Extinct Pigeons and Declining Bat Populations: Are Large Seeds Still Being Dispersed in the Tropical Pacific? In *Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and Conservation*. (ed. D.J. Levey, W.R. Silva and M. Galetti), pp. 381-395. Wallingform, UK.
- Mc Donald PG, Fonseca CR, Overton JMC, Westoby M (2003) Leaf-size divergence along rainfall and soil-nutrient gradients: is the method of size reduction common among clades? *Functional Ecology*, **17**, 50-57.
- Mc Kay JK, Latta RG (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 285-291.
- Merilä J, Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 892-903.
- Meziane D, Shipley B (1999) Interacting determinants of specific leaf area in 22 herbaceous species: effects of irradiance and nutrient availability. *Plant, Cell & Environment*, **22** (5), 447-459.
- Mills LS, Allendorf FW (1996) The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*, **6**, 1509–1518.
- Moles A, Westoby M (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, **92** (3), 372-383.
- Morand ME, Brachet S, Rossignol P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N (2002) A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology*, **11** (3), 377-385.
- Morat P (1993) Our knowledge of the flora of New Caledonia: endemism and diversity in relation to vegetation types and substrates. *Biodiversity Letters*, **1**, 72-81.

- Moretta P, Ghisalberti E, Trengove R (2001) Longitudinal Variation in the Yield and Composition of Sandalwood Oil from *Santalum spicatum*. *Sandalwood Research Newsletter*, **14**, 5-7.
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, **3**, 175-182.
- Moritz C (1994) Defining significant units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.
- Moritz C, Faith D (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, **7**, 419-429
- Müller PM, Lamparsky D (1991) *Perfumes. Art, Science and Technology*. Elsevier Science Publishers LTD, England, 298.
- Murienne J, Grandcolas P, Piulachs MD, Bellés X, D'Haese C, Legendre F, Pellens R, Guilbert E (2005) Evolution on a shaky piece of Gondwana: is local endemism recent in New Caledonia? *Cladistics*, **21** (1), 2-7.
- Murray BR, Brown AHD, Dickman CR, Crowther MS (2004) Geographical gradients in seed mass in relation to climate. *Journal of Biogeography*, **31**, 379-388.
- Murray BR, Gill AM (2001) A comparative study of interspecific variation in fruit size among Australian eucalypts. *Ecography*, **24**, 651-658.
- Murray MJ, Lincoln DE (1970) The genetic basis of acyclic oil constituents in *Mentha citrata* Ehrh. *Genetics*, **65**, 457-471.
- Myers N, Mittermeier R, Mittermeier CG, DaFonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858.
- Nasi R (1994) Le Genre Santalum en Nouvelle-Calédonie. Rapport interne non spécifique Cirad-forêt, Nouméa.
- Nasi R, Erhart Y (1999) Le Santal, un parfum de prospérité, 2<sup>ème</sup> partie – les plantations. *Bois et Forêts des Tropiques*, **248**, 5-16.
- Neale DB, Sederoff RR (1989) Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, **77**, 212-216.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nelson ND, Rietveld WJ, Isebrands JG (1981): Xylem ethylene production in five black walnut families in the early stages of heartwood formation. *Forest Sciences*, **27**(3), 537-543

- Nevo E (2001) Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress. *Proceedings of the National Academic of Science of USA*, **98**(11), 6233-6240
- Newton AC, Allnut TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 140-145.
- Nickrent DL, Malécot V (2001) A molecular phylogeny of Santalales. Pages 69-74 in A. Fer, P. Thalouarn, D. M. Joel, L. J. Musselman, C. Parker, and J. A. C. Verkleij. Eds. Proceedings of the 7<sup>th</sup>. International Parasitic Weed Symposium. Faculté des Sciences, Université de Nantes, Nantes, France.
- Nickrent DL, Musselman LJ (2004) Introduction to Parasitic Flowering Plants. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0330-01.
- Niinemets U, Tenhunen JD (1997) A model separating leaf structural and physiological effects on carbon gain along light gradients for the shade-tolerant species *Acer saccharum*. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 845–866.
- Nikiforov A, Jivoretz L, Machatschek S, Stanek W, Buchbauer G (1990) *Liebigs Ann Chem.*, **119**, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique
- Olmstead RG, Palmer JD (1994) Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany*, **81**, 1205-1224.
- Page RDM (1996) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- Palme AE, Vendramin GG (2002) Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology*, **11**, 1769-1779.
- Pate JS (2001) Haustoria in action: case studies of nitrogen acquisition by woody xylem-tapping hemiparasites from their hosts. *Protoplasma*, **215** (1-4), 204-17.
- Pellecuer J, Allegrini J, Simeon De Buochberg M (1976) Huiles essentielles bactéricides et fongicides. *Revue de l' Institut Pasteur Lyon*, **9**, 135-159.
- Perrier X, FloriA, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. (ed. P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier, and J. C. Glaszmann), pp. 43-76. Enfield, Science Publishers. Montpellier.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP (2003) Logiciel DARWIN (version 4.0.).
- Picard M (1999) L'archipel néo-calédonien : 300 millions d'années pour assembler les pièces d'un puzzle géologique, Centre de Documentation pédagogique de Nouvelle-Calédonie
- Pichersky E, Gang DR (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, **5** (10), 439-445.

- Poorter H, Remkes C (1990) Leaf area ratio and net assimilation rate of 24 species differing in relative growth rate. *Oecologia*, **13**, 553–559.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure using Multilocus Genotypes. *Genetics*, **155**: 945-959.
- Quémin C (1988) Etudes sur le Santal (*Santalum austrocaledonicum*). Mémoire de 3<sup>ème</sup> année. Ecole Nationale des Ingénieurs de Travaux des Eaux et Forêts.
- Radomiljac AM, Ananthapadmanabho HS, Welbourn RM, Satyanarayana Rao K (1998) *Sandal and its products: proceedings of an International Seminar held on 18-19 December 1997, Bangalore, India*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 203 p.
- Ranibai P, Ghatge BB (1986) Bhattacharyya S.C., *Ind J. Chem*, **25** (B), 1006, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveaux sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (v. 3.2a): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of heredity*, **86**, 248-249.
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS (1997) From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, **22**, 13730–13734
- Rhoades DF (1979) Evolution of plant chemical defence against herbivores. In: *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites* (ed. G.A. Rosenthal and D.H. Janzen), pp 1-55. Academic Press, New York.
- Rhoades DF, Cates RG (1976) Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. *Recent Advance in Phytochemistry.*, **19**, 168-213.
- Richards GC (1990) The spectacled flying-fox, *Pteropus conspicilatus* (Chiroptera: Pteropodidae), in North Queensland. 2. Diet, seed, dispersal and feeding ecology. *Australian Mammalogy*, **13**, 25-31.
- Richier De Forges B, Jaffre T, Chazeau J (1998) La Nouvelle-Calédonie, vestige du continent de Gondwana. *Le courrier de l'environnement de l'INRA. Sauve qui peut*, **10**.
- Robert P, Escoufier Y (1976) A unifying tool for linear multivariate statistical methods : the RV coefficient. *Applied Statistics*, **25**, 257-265.
- Rohmer M (1999) In: *Comprehensive Natural Product Chemistry. Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. (ed. D.E. Cane), Vol 2 pp. 45-67, Pergamon, Oxford, UK and references therein.
- Rohmer M (2003) Mevalonate-independent methylerythriol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure Applied Chemistry*, **75** (2-3), 375-387.
- Rossetto M, Slade RW, Baverstock PR, Henry RJ, Lee LS (1999) Microsatellite variation and assessment of genetic structure in a tea tree (*Melaleuca alternifolia* – Myrtaceae). *Molecular Ecology*, **8**, 633–643.

Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.

Saez F (1999) Essential oil variability of *Thymus baeticus* growing wild in southeastern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**, 269-276.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.

Salgueiro LR, Vila R, Tomas X, Cañigüeral S, Paiva J, Proença Da Cunha A, Adzet T (2000) Chemotaxonomic study on *Thymus villosus* from Portugal. *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 471-482.

Sanou H, Picard N, Lovett PN, Dembélé M, Korbo A, Diarisso D, Bouvet JM. Phenotypic variation of agromorphological traits of the shea tree, *Vitellaria paradoxa* C.F Gaertn, in Mali. *Genetical Resources and Crop Evolution*, **in press**.

Sanou, H., Lovett, N. & Bouvet, J-M. (2005) Comparison of quantitative and molecular variation in agroforestry populations of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn) in Mali. *Molecular Ecology*, **14**, 2601-2610.

SAS Institute Inc. (1990) *SAS/STAT user's guide*, release 6.03 edition. SAS Institute Inc., Gary, N.C.

Savolainen O, Kuittinen H (2000) *Small Populations Processes, Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. (ed. A. Young, D. Boshier, and T. Boyle), pp. 91-100. United Nations Development Program, New York, USA.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis*. User manual version 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland. Free program distributed by the authors over internet from [lfb.unige.ch/arlequin/](http://lfb.unige.ch/arlequin/)

Semmler FW (1910) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **43**, 1893, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveaux sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique.

Shankaranarayana KH (1987) Part on the content and composition of oil from heartwood at different levels in sandal. *Indian Perfumer*, **31** (3), 211-214.

Shankaranarayana KH, Shivaramakrishnan VR, Ayyar KS, Sen Sarma PK (1979) *J. Entomol. Res.*, **3**, 116, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveaux sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique.

Shelton D, Aitken K, Doimo L, Leach D, Baverstock P, Henry R (2002) Genetic control of monoterpene composition in the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Cheel) *Theoretical and Applied Genetics*, **105**, 377-383.

Shepherd M, Chaparro JX, Teasdale R (1999) Genetic mapping of monoterpene composition in an interspecific eucalypt hybrid. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**, 1207-1215.



Shineberg D (1967) *They came for Sandalwood. A study of the Sandalwood trade in the South-West Pacific*. Melbourne University Press pp. 1830-1865.

Simpson GG (1953) *The major features of evolution*. Columbia University Press, New York.

Skoula M, El Hilali I, Makris AM (1999) Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**, 559-568.

Slatkin M (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research*, **58**, 167-175.

Smith RH (1966) Monoterpenes composition of *Pinus ponderosa* xylem resin and of *Dendroctonus brevicomis* pitch tubes. *Forest Science*, **12**, 63-70.

Smith RM, Morris PR (1979) Composition of Fijian sandalwood oil (*Santalum yasi*). *International Flavour Food Additives*, **10** (2), 57.

Spieth PT (1974) Gene flow and genetic differentiation. *Genetics*, **78**, 951-965.

Spitze K (1993) Population genetic structure in *Daphnia obtusa*: Quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, **135**, 367-374.

Stahl E (1888) Pflanzen und schnecken. Eine biologische Studie über die Schutzmittel der Pflanzen gegen Schneckenfraass. *Jena. Z. Naturw*, **22**, 557.

Stahl-Biskup E (1984) Chemical polymorphism of essential oil in *Thymus praecox* ssp. *arcticus* (Lamiaceae) from Greenland. *Nordic Journal of Botany*, **4** (5), 597-600.

Stahl-Biskup E (1986) The essential oil from Norwegian *Thymus* species. I. *Thymus praecox* ssp. *arcticus*. *Planta Medicina*, **1**, 36-38.

Stahl-Biskup E (2002) Essential oil chemistry of the genus *Thymus* - a global view. In: *Thyme: the genus Thymus* (ed. E. Stahl-Biskup and F. Sáez), pp. 75-124. London.

Stamp N (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology*, **78**, 23-55.

Steierer F (2004) Inventaire des populations de Santal (*Santalum austrocaledonicum*) sur les îles de Lifou et Ouvéa, Nouvelle-Calédonie. Mémoire FIF. Ecole Nationale des Ingénieurs du Génie Rural, des Eaux et des Forêts.

Stevens GR (1977) Mesozoic Biogeography of the South-West Pacific and its relationship to plate tectonics. International Symposium on Geodynamics in South-West Pacific, Noumea (New Caledonia), 27 August- 2 September 1976. Editions Technip, Paris, 309-326.

Stevens GR (1980) *New Zealand adrift. The theory of continental drift in a New Zealand setting*. A. H. & A. W. Reed, Wellington, 442.

Stevenson J, Dobson JR, Prosser IP (2001) Late quaternary record of environmental change and human impact from New Caledonia. *Palaeogeography, palaeoclimatology, palaeoecology*, **168**, 97-123

- Stone C, Bacon PE (1995) Leaf dynamics and insect herbivory in a *Eucalyptus camaldulensis* forest under moisture stress. *Australian Journal of Ecology*, **20**, 473-481.
- Takhtajan A (1969) Flowering Plants, origin and Dispersal. Oliver & Boyd, Edinbourg, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique.
- Tassin J (2003b) Vers la valorisation durable du Santal. *Palabre coutumier*, **9**, 41-45.
- Tassin J (2005) Status of research on *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonia: current knowledge and future prospects. In: *Proceedings of the regional workshop on sandalwood research, development and extension in the Pacific islands and Asia*. (ed. L. Thomson, S. Blai, and L. Sovea), pp. 135-141. SPRIG – CPS, Nouméa, New Caledonia.
- Tassin J, Brinkert M, Steierer F (2005) Bilan du dernier inventaire du santal aux Iles Loyauté. *Les cahiers de l'agriculture et de l'environnement*, **13**, 16-17.
- Thompson JD (2002) Population structure and the spatial dynamics of genetic polymorphism in thyme. In: *Thyme: the Genus Thymus* (ed. E. Stahl-Biskup, and F. Saez), pp. 44–74. Taylor & Francis, London,
- Thompson JN (1989) Concepts of coevolution. *Trends in Ecology and Evolution*, **4**, 179-183.
- Thompson JN (1994) *The coevolutionary process*. University of Chicago Press, Chicago.
- Tripiana V, Bourgeois M., Verhaegen D, Vigneron P, Bouvet JM. Combining microsatellites, growth and adaptive traits for managing in situ genetic resources of *Eucalyptus urophylla*, **in press**.
- Tuomi J, Fagerstrom T, Niemela P (1991) Carbon allocation, phenotypic plasticity, and induced defenses. In: *Phytochemical induction by herbivores*. (ed. D.W. Tallamy and M.J. Raupp), pp. 85-104, Wiley, New York.
- Vahirua-Lechat I (1994) Thèse, Montpellier, cité dans Alpha T (1997) Etude des concrètes et des essences de santals d'origine océanienne, élucidation de nouveau sesquiterpénoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse, Université française du Pacifique.
- Van Balgooy MMJ (1971) Plant-geography of the pacific. *Blumea*, **6**, 1-222.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite software. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Veillon JM, Jaffré T (1995) Le Santal (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) en Nouvelle-Calédonie : taxonomie, distribution et écologie. In : *Genum, Frox, and Erhart, op. cit.* pp. 25-36.
- Vendramin GG, Lelli L, Rossi P, Morgante M (1996) A set of primers for the amplification 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, **5** (4), 595-598.

- Vergheze J, Sunny TP, Balakrishnan KV (1990) (+)- $\alpha$ -santalol and (-)- $\alpha$ -santalol (Z) Concentration, a New Quality Determinant of East Indian Sandalwood Oil. *Flavour and Fragrance Journal*, **5**, 223-226.
- Vokou D, Kokkini S, Bessiere JM (1993) Geographic variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemistry and Systematics and Ecology*, **21**, 287–295.
- Vokou D, Margaris NS, Lynch JM (1984) Effects of volatile oils from aromatic shrubs on soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, **16**, 509-513.
- Warburton CL, James EA, Fripp YJ, Trueman SJ, Wallace HM (2000) Clonality and sexual reproductive failure in remnant populations of *Santalum lanceolatum* (Santalaceae). *Biological Conservation*, **96**, 45-54.
- Ward JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, **58**, 236-244.
- Watson DM (2002) A conceptual framework for studying species composition in fragments, islands and other patchy systems. *Journal of Biogeography*, **29**, 823-834.
- Weir BS (1990) *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Weising K, Gardner RC (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, **42**, 9-19.
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IA (2002) Plant Ecological Strategies: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 125-159.
- Whitlock MC, Mc Cauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{st}$  not equal to  $1/(4Nm+1)$ , *Heredity*, **82**, 117-125.
- Whittaker RH, Feeny PP (1971) Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science*, **171**, 757-770.
- Williams CM (1970) Hormonal interactions between plants and insects. In: *Chemical Ecology* (ed. E. Sondheimer, and J.B. Simeone), pp. 103-132. Academic, New York.
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, **64**, 3-19.
- Wink M, Carey DB (1994) Variability of quinolizidine alkaloid profiles of *Lupinus argenteus* (Fabaceae) from North America. *Biochemistry and Systematics and Ecology*, **22** (7), 663–669.
- Winn AA (1988) Ecological and evolutionary consequences of seed size in *Prunella vulgaris*. *Ecology*, **69**, 1537-1544.
- Wolfe JA (1995) Paleoclimatic estimates from tertiary leaf assemblages. *Annual review of Earth and Planetary Sciences*, **23**, 119-142.

Wood DM, Morris WF (1990) Ecological constraints to seedling establishment on the pumice plains, Mount St Helens, Washington. *American Journal of Botany*, **77**, 1411-1418.

Wright S (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.

Wright S (1969) *Evolution and the genetics of populations. Vol. 2. The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.

Young AG, Boshier DH, Boyle TJ (2000) *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. (ed. A. Young, D. Boshier, and T. Boyle), pp. 1-3. United Nations Development Program, New York, USA,

Zundel JL (1976) *Etude chimique et biochimique de l'essence de santal*, Thèse, Strasbourg. R 2.1.0 – A language and Environment Copyright, 2005. The R development Core Team.



## *Annexes*



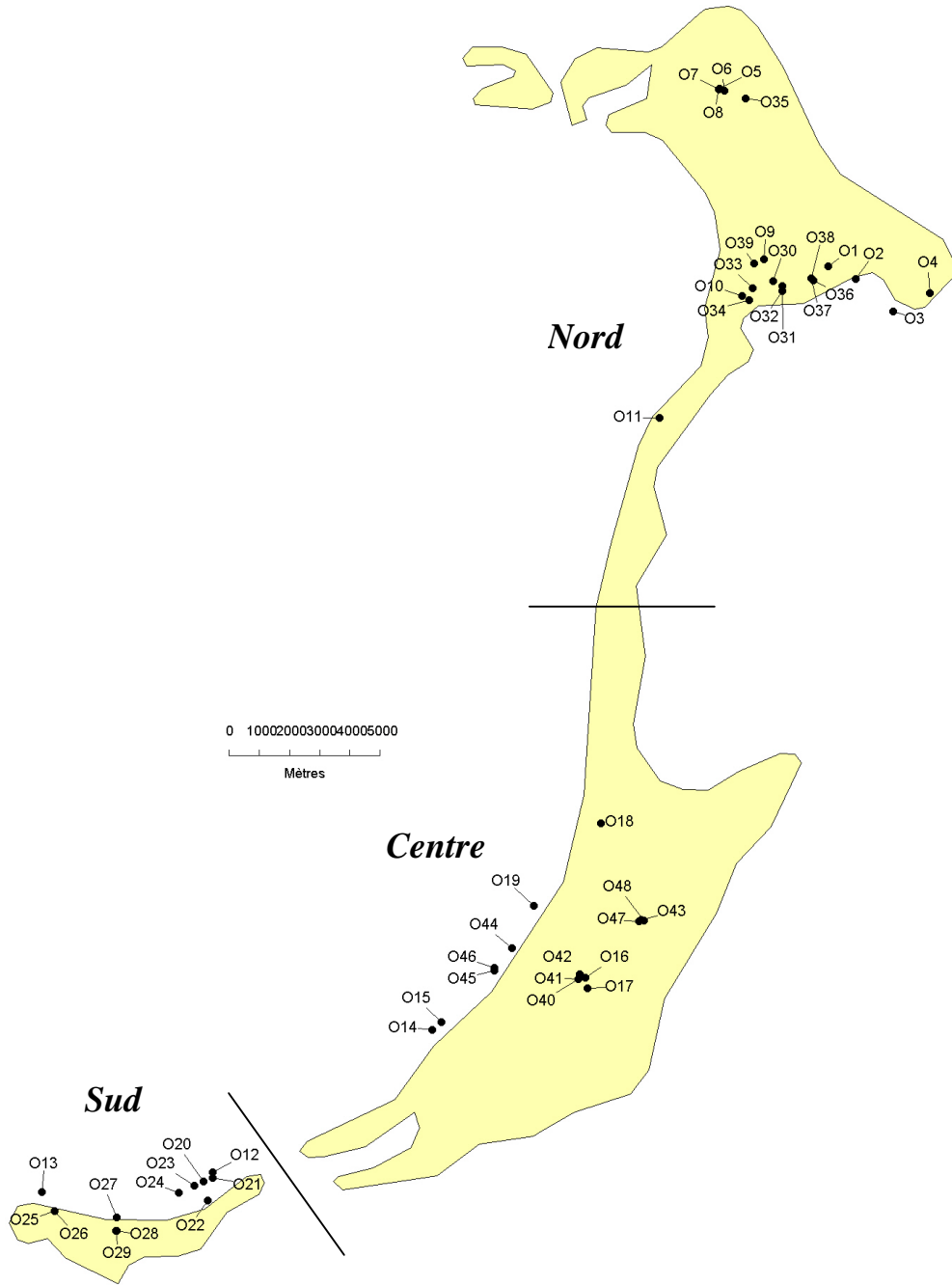
## *ANNEXE 1*

### *Localisation de l'échantillonnage en Nouvelle-Calédonie*



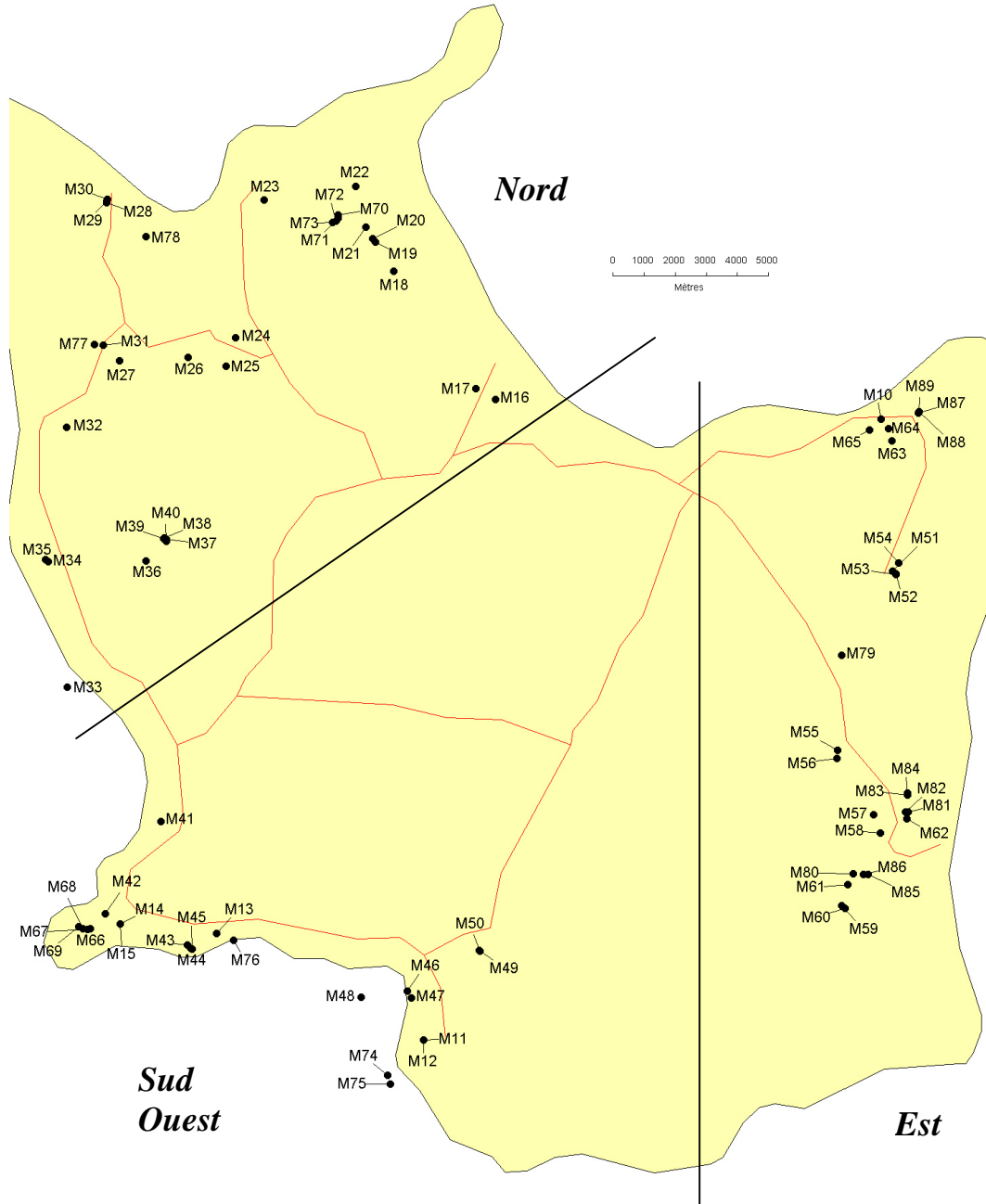


# Ouvéa

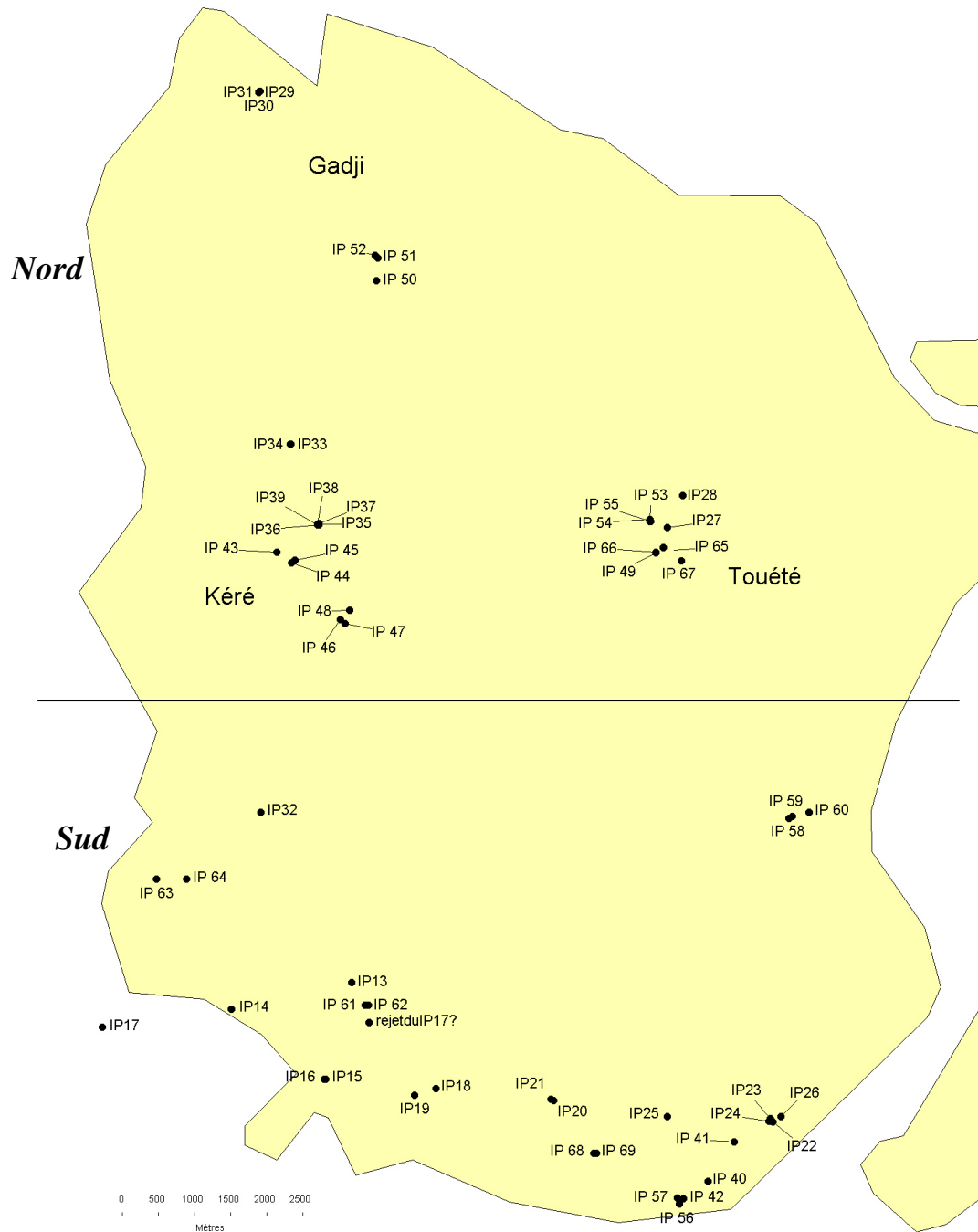




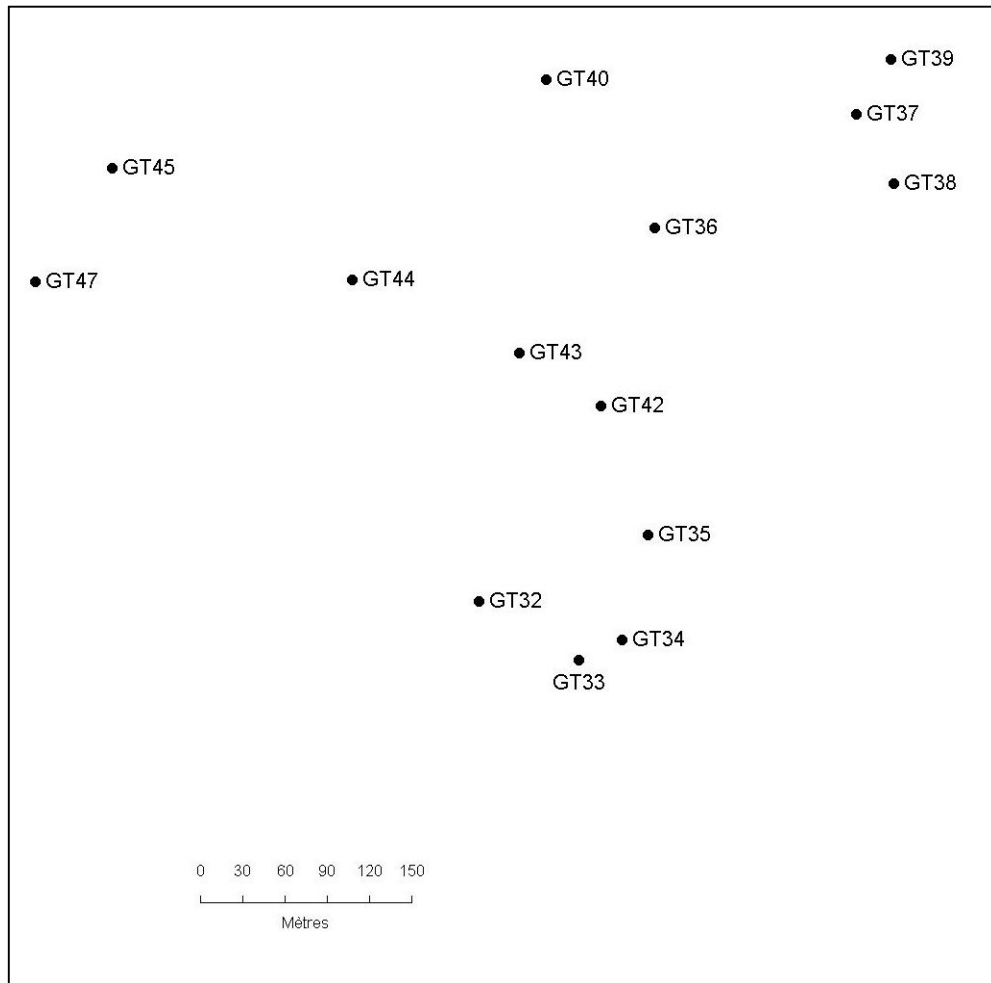
# Maré



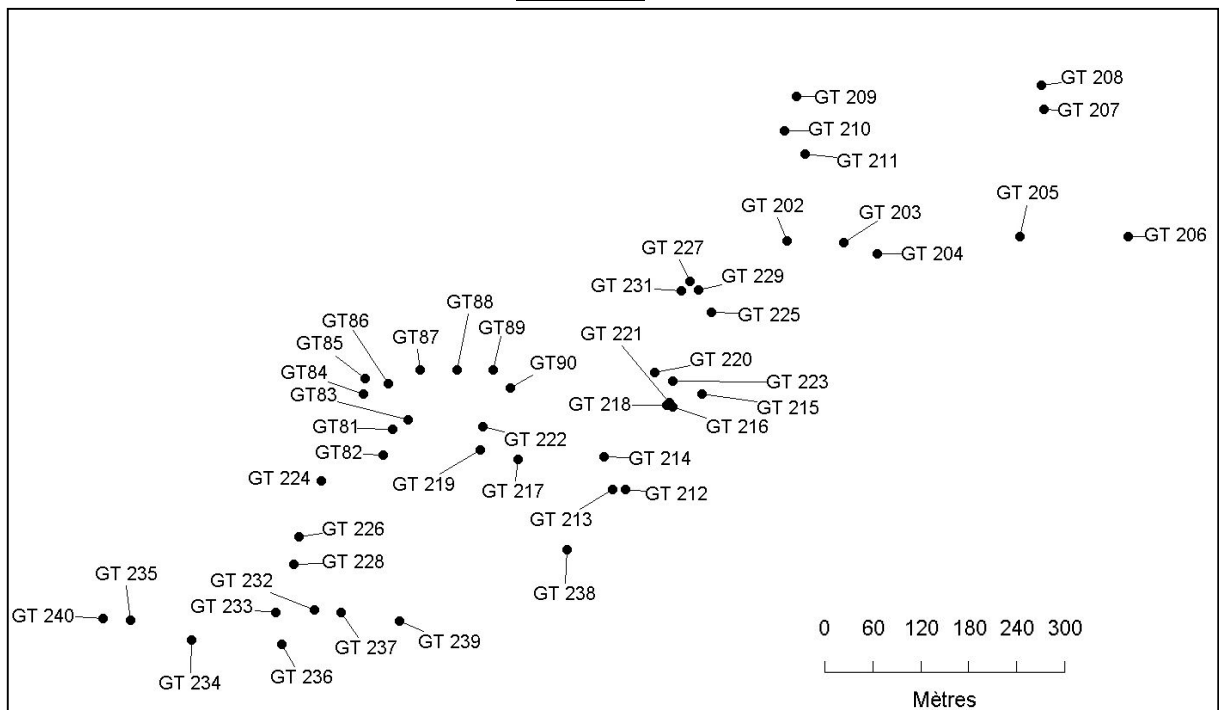
# Ile des Pins



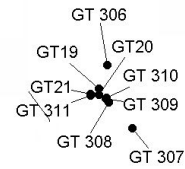
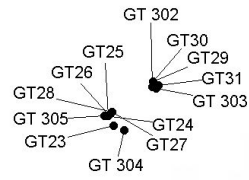
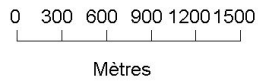
# Ouen Toro



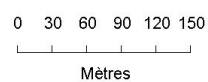
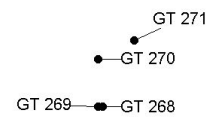
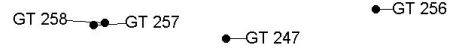
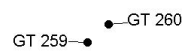
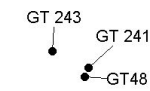
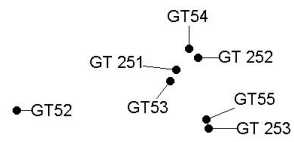
# Païta



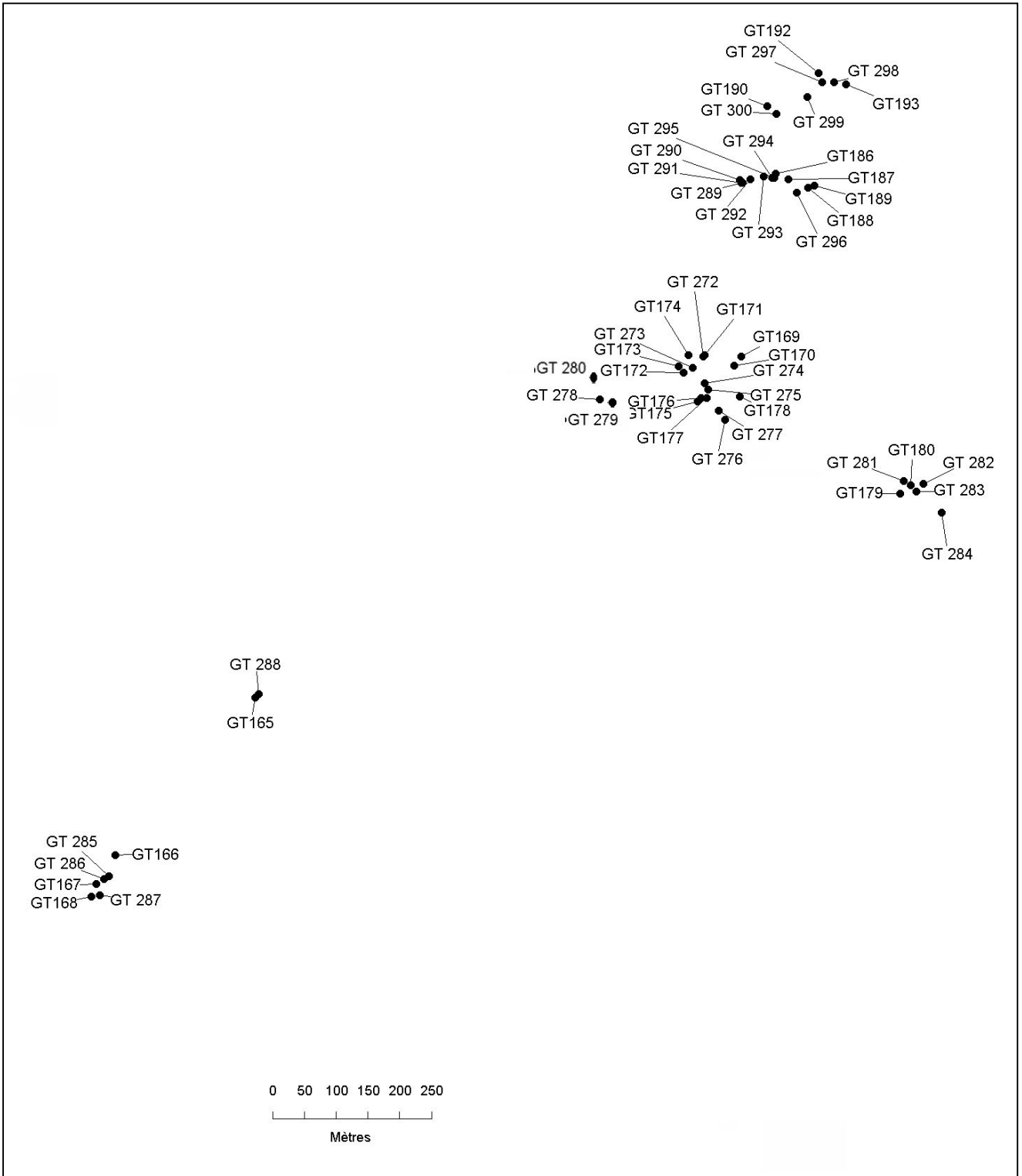
# Pindai



# Malhec



# Hienghène







## ***ANNEXE 2***

***Recherche d'activité antitermite et antifongique des  
extraits du Santal***



# Recherche d'activité antitermite et antifongique des extraits du Santal

Etude réalisée au CIRAD-bois par Nadine Amusant

Il existe différentes méthodes d'extraction des composés du bois :

- Le dichlorométhane permet d'extraire les cires, les huiles, les alcaloïdes et les aglycones,
- L'acétone permet d'extraire les alcaloïdes, les aglycones et les glycosides,
- Le méthanol permet d'extraire les sucres, les aminoacides et les glycosides

Pour la suite de l'étude on considère que :

- le dichlorométhane extrait une première fraction de composés que l'on appellera A,
- une première extraction au dichlorométhane suivie d'une extraction à l'acétone entraîne une deuxième fraction de composés que l'on appellera B.
- une première extraction au dichlorométhane suivie respectivement d'une extraction à l'acétone et au méthanol entraîne une troisième fraction de composés que l'on appellera C.

Dans les essais qui suivent, nous avons utilisé le bois de Santal de *Santalum austrocaledonicum*.

## 1/ Recherche d'une activité anti-fongique

Nous avons testé les fractions pures provenant de chacune des extractions sur un champignon lignivore : *Coniophora puteana*. Un papier de cellulose imprégné d'extrait non dilué est placé sur un milieu de culture en présence du mycélium et l'on suit la croissance de ce dernier. Deux essais sont menés en parallèle :

- **Témoin** : Dans une boîte de Pétri, un papier de cellulose non imprégné est placé sur un milieu de culture en présence du mycélium.
- Dans une boîte de Pétri, un papier de cellulose imprégné avec les extraits est placé sur un milieu de culture en présence du mycélium. Si le mycélium évite tout contact avec le champignon on en conclue que l'extrait présente une activité fongistatique



Fig A1: Témoin. Papier non traité recouvert par le mycélium

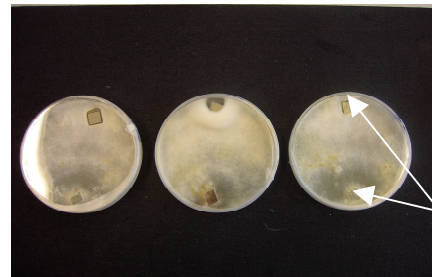


Fig A2: Papier non traité, non recouvert par le mycélium  
Dépôt de mycélium

Extraction	Activité antifongique	Pas d'activité
Témoin	X	
Dichlorométhane (Fraction A)	X	
Acétone (Fraction A et B)	X	
Méthanol (Fraction A, B et C)	X	
Dichlorométhane + acétone (Fraction B)		X
Dichlorométhane + acétone + méthanol (Fraction C)		X

L'extraction avec les trois solvants met en avant un effet fongistatique des extraits provenant de ces derniers sur le mycélium et l'on constate qu'avec les extractions successives, seuls les composés présents dans la fraction A obtenue avec le dichlorométhane présente une activité.

## 2/ Recherche d'activité anti-termite

DISPOSITIFS : boîte de Pétri avec du sable où sont placés termites et :	RESULTATS (moyennes pour les échantillons)	CONCLUSIONS
<b>PREMIERE SERIE (4 échantillons par dispositif)</b>		
<i>Lorsque qu'il ne reste aucun survivant dans le dispositif a, on arrête les essais b et c et l'on détermine le taux de mortalité. Si des termites de b et c ont survécu, c'est qu'ils se sont alimentés.</i>		
a/ aucune source d'alimentation. Pour déterminer le taux de survie sans nourriture.	Survie : 19 jours	Gêne occasionnée par la présence des composés chimiques de la sciure. On peut dire à ce stade que les termites sont morts à la suite de l'ingestion des sciures, ou par contact ou inhalation des odeurs dégagées par ces dernières.
b/ sciure de Pin sylvestre servant de source d'alimentation. Sert à vérifier la vitalité de la colonie de termites.	Taux de mortalité 17%	
c/ sciure de Santal	Taux de mortalité 99%, presque tous morts à 13 jours (premiers morts à 8 jours)	
<b>DEUXIEME SERIE – (5 échantillons par dispositif)</b>		
<i>Lorsque qu'il ne reste aucun survivant dans le dispositif d, on arrête les essais e, f et g et l'on détermine le taux de mortalité et celui de consommation du papier de cellulose.</i>		
d/ Aucune source d'alimentation. Pour déterminer le taux de survie sans nourriture.	Survie 19 jours	
e/ Papier de cellulose non imprégné servant de source d'alimentation. Sert à vérifier la vitalité de la colonie de termites.	Taux de survie fort et identique pour e et f.	Le solvant n'a pas d'effet sur la survie
f/ Papier de cellulose avec le solvant. Permet de vérifier que le solvant est sans effet sur la colonie utilisée.		
g/ Papier de cellulose avec extraits santal A B et C à 2 concentrations : 6 et 53%	Concentration : 6%                      53%	
• Extraction au dichlorométhane : fraction A	consommation du papier de cellulose : <b>22%</b> Mortalité: <b>70%</b>	l'extrait est toxique
• Extraction au dichlorométhane puis acétone : fraction A+B	Conso : <b>26%</b> <b>0%</b> M : <b>77%</b> <b>90%</b>	l'extrait est toxique
• Extraction au dichlorométhane puis acétone et méthanol : fraction A+B+C	Conso : <b>38%</b> <b>0%</b> M : <b>76%</b> <b>98%</b>	l'extrait est toxique
• Extraction dichlorométhane/acétone : fraction B	Conso : <b>53%</b> <b>0%</b> M : <b>51%</b> <b>100%</b>	pas d'effet répulsif et pas effet toxique de l'extrait
• Extraction dichlorométhane/acétone /méthanol : fraction C	Conso : <b>100%</b> <b>0%</b> , M : <b>35%</b> <b>100%</b>	effet appétant et pas effet toxique de l'extrait (nombreux hétérosides appétants pour les termites)

### **3/ Conclusion de l'étude des propriétés anti-termite et anti-fongique du Santal**

Les molécules présentes dans la fraction dichlorométhane jouent un rôle important dans les mécanismes de la durabilité naturelle du Santal à l'égard des termites et des champignons. Deux types d'effets ont été mis en évidence :

- un léger effet répulsif et un effet toxique observé sur les termites. Le seuil de toxicité se situe entre 6 % et 53 % (m/m) d'extrait.
- un effet fongistatique sur les champignons

Les huiles essentielles de santal contiennent 80% d'alcools terpéniques (santalol, bergamotol...), il serait intéressant de tester directement ces composés afin de s'assurer que l'activité repose sur la présence de ces molécules ou si d'autres composés présents dans la fraction dichlorométhane participent à cette activité. Idéalement, il faudrait identifier les composés responsables de l'activité biologique, et réaliser une étude génétique sur les gènes qui les codent afin de pouvoir mieux décrire leur activité.



## ***ANNEXE 3***

- Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A, Bouvet JM (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Molecular Ecology*, **14** (7), 1979-1989





# Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago

L. BOTTIN,\* D. VERHAEGEN,\* J. TASSIN,\*† I. OLIVIERI,‡ A. VAILLANT\* and J. M. BOUVET\*

\*CIRAD, Département Forêt, Unité de Recherche 'Diversité Génétique et Amélioration des Espèces Forestières', campus de Baillarguet TA 10C, 34398, Montpellier cedex 5, France, †IAC, Institut Agronomique Néo-Calédonien B.P. 73, 98890, Païta, Nouvelle-Calédonie, ‡Université Montpellier 2, cc065, Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France

## Abstract

We present a study of the genetic diversity and structure of a tropical tree in an insular system. *Santalum austrocaledonicum* is endemic to the archipelago of New Caledonia and is exploited for oil extraction from heartwood. A total of 431 individuals over 17 populations were analysed for eight polymorphic microsatellite loci. The number of alleles per locus ranged from 3 to 33 and the observed heterozygosity per population ranged from 0.01 in Maré to 0.74 in Ile des Pins. The genetic diversity was lowest in the most recent islands, the Loyautés, and highest in the oldest island, Grande Terre, as well as the nearby small Ile des Pins. Significant departures from panmixia were observed for some loci–population combinations (per population  $F_{IS} = 0–0.03$  on Grande-Terre and Ile des Pins, and  $0–0.67$  on Loyautés). A strong genetic differentiation among all islands was observed ( $F_{ST} = 0.22$ ), and the amount of differentiation increased with geographic distance in Iles Loyauté and in Grande Terre. At both population and island levels, island age and isolation seem to be the main factors influencing the amount of genetic diversity. In particular, populations from recent islands had large average  $F_{IS}$  that could not be entirely explained by null alleles or a Wahlund effect. This result suggests that, at least in some populations, selfing occurred extensively. Conclusively, our results indicate a strong influence of insularity on the genetic diversity and structure of *Santalum austrocaledonicum*.

**Keywords:** conservation, gene flow, insularity, nuclear microsatellites, population genetic structure, sandalwood

Received 28 September 2004; revision received 12 January 2005; accepted 8 March 2005

## Introduction

Island systems have long fascinated biologists, in particular since Darwin's theory of evolution by natural selection led to consider them as 'evolutionary laboratories' (Darwin 1859). Islands are strongly attractive environments for studying evolution for various reasons: they present discrete entities; despite their small size, they contain a variety of habitats; and they are often geologically dynamic (Emerson 2002). From a genetic point of view, at the within-island level, populations have been characterized as depauperate,

because of possible recency of the founding event, isolation from source population, and stochastic processes due to their limited size (Carlquist 1980; Crawford *et al.* 1987, 1988, 1990; Brauner *et al.* 1992; Elisens 1992; Kwon & Morden 2002). At the among-island level, the presence of oceanic barriers restricts gene flow between populations. Hence populations from different islands are expected to be strongly differentiated, at least at neutral loci.

Although general expectations exist on the impact of island systems on genetic diversity structuring, especially those concerning natural selection and random drift (Barton 1989), empirical evidence is still lacking to confirm or attenuate the general expected pattern on plant species. In particular, the genetic structure of forest tree species is poorly documented in fragmented habitats (Savolainen

Correspondence: L. Bottin, Fax: 04 67 59 37 33;  
E-mail: bottin@cirad.fr

& Kuittinen 2000) and archipelagos (Sheely & Meagher 1996). However there is an increasing number of studies looking for genetic effects in other plants of recent, anthropogenic, habitat fragmentation (e.g. Ellstrand & Elam 1993; Gustafsson 2000; Young & Clarke 2000). In most cases, a loss of genetic variability and increased genetic differentiation of subpopulations through drift are predicted and have been found in some systems (Young *et al.* 1996; Newman & Pilson 1997; Young & Clarke 2000). Hamrick *et al.* (1992) and Hamrick & Godt (1996) studied the genetic diversity in continental forest tree species and underlined the factors influencing differentiation between populations (mating system, life history, distribution area, etc.), but did not consider the influence of insularity (e.g. isolation and size of populations).

In this study we address a number of questions related to the genetic diversity patterns of an insular forest tree species, *Santalum austrocaledonicum* (sandalwood) in the archipelago of New Caledonia. *Santalum austrocaledonicum* is, like all Santalaceae (Malécot *et al.* 2004) a hemiparasitic forest tree species (Nasi & Ehrhart 1996) endemic to New Caledonia and Vanuatu. It reaches 8 m in height and 30 cm in trunk diameter. It grows in lowlands, preferentially in open areas (Quémin 1988; Ehrhart 1998). As a hemiparasitic plant species, it cannot grow out of the vicinity of other species, particularly nitrogen-fixing species like *Acacia* and *Casuarina* (Quémin 1988; Radomiljac & McComb 1997; Ehrhart 1998). It occurs on all islands of the archipelago at altitudes lower than 200 m (Quémin 1988) as isolated trees or patches of trees of various sizes. Sandalwood reproduction is still poorly documented. The seeds are fleshy and small (about 1 cm) and seem to be disseminated by frugivorous birds (*Columba vitiensis* was seen eating fruits) that can travel among islands (Gibbs *et al.* 2001), and potentially bats (Cox *et al.* 1991). *Santalum austrocaledonicum* has been one of the most exploited sandalwood species since the 19th century. Essential oils extracted from heartwood are used in medicine and the perfume industry. Still exploited, some populations, particularly those of the Iles Loyauté, are seriously threatened.

Using eight microsatellite markers specifically developed for the species studied, we compared the pattern of genetic diversity among islands of the archipelago. We then tried to relate the amount of genetic diversity to the size and isolation of islands, and to look for isolation-by-distance patterns among and within islands. We also asked whether there is any evidence for an impact of the last maximum glaciations on the structure of the genetic diversity. The New Caledonia archipelago is a good system to address these questions, as it consists of six islands of various sizes and at various distances from the largest and oldest of them, Grande-Terre. Each island is large enough that it can itself be subdivided into a few geographic regions.

## Material and methods

### *Sampling methodology, DNA extraction and genetic analysis*

Leaves of *Santalum austrocaledonicum* were collected on individuals growing in natural stands throughout the different islands: Grande Terre (island size: 16 350 km<sup>2</sup>), Ile des Pins (152 km<sup>2</sup>), Iles Loyauté (Ouvéa (132 km<sup>2</sup>), Lifou (1196 km<sup>2</sup>), Maré (650 km<sup>2</sup>)) (Fig. 1). Population sampling areas are shown in Table 1. On Grande Terre, the largest island, all known populations were sampled. These populations were far from each other (at least 25 km) and had a small number of individuals so that the sampling was exhaustive. Ouen Toro was an exception as it was densely populated, so in this population individuals sampled were only a subset of the total population. Only populations with more than 10 individuals were conserved for the genetic analysis: Pindai, Malhec, Païta, Hienghène, Tiéa and Ouen Toro. Hienghène was the only population known on the east coast, where the climate is wetter and the vegetation more luxurious than on the west coast.

On other islands, the situation was quite different: individuals were scattered over the whole area, so like in Ouen Toro, the samples, collected everywhere in the islands, represented a subset of the total population. In order to have population areas more comparable with those of Grande Terre, and to avoid a potential effect of substructuring on the structure indices, we tried to determine subpopulations in these islands according to the spatial distribution of individuals. Samples from Loyauté islands were divided in three populations: north (N), midlands (M) and south (S) for Ouvéa and Lifou, north (N), southeast (SE) and southwest (SW) for Maré. Ile des Pins was subdivided into two areas, north (N) and south (S).

Leaves were collected between February 1998 and November 2003, but each individual, identified by its geographical coordinates, was only sampled once. Leaf specimens were placed in sealed plastic bags containing silica gel, until DNA extraction. Total DNA was extracted from 100 mg of dry leaf material using a MATAB method derived from Bousquet *et al.* (1990), with one additional chloroform-isoamyl alcohol (24:1) extraction. The genetic analysis was done using eight nuclear microsatellites: *mSaCIRE09*, *mSaCIRH09*, *mSaCIRG01*, *mSaCIRH11*, *mSaCIRG10*, *mSaCIRF04*, *mSaCIRF10* and *mSaCIRH10*, designed specifically for *Santalum austrocaledonicum*. Their characteristics and the methods used to obtain them are described elsewhere (Bottin *et al.* in press).

### *Selection of individuals for the analysis*

As sandalwood can reproduce by suckering (Quémin 1988), sampling of several individuals in a restricted area

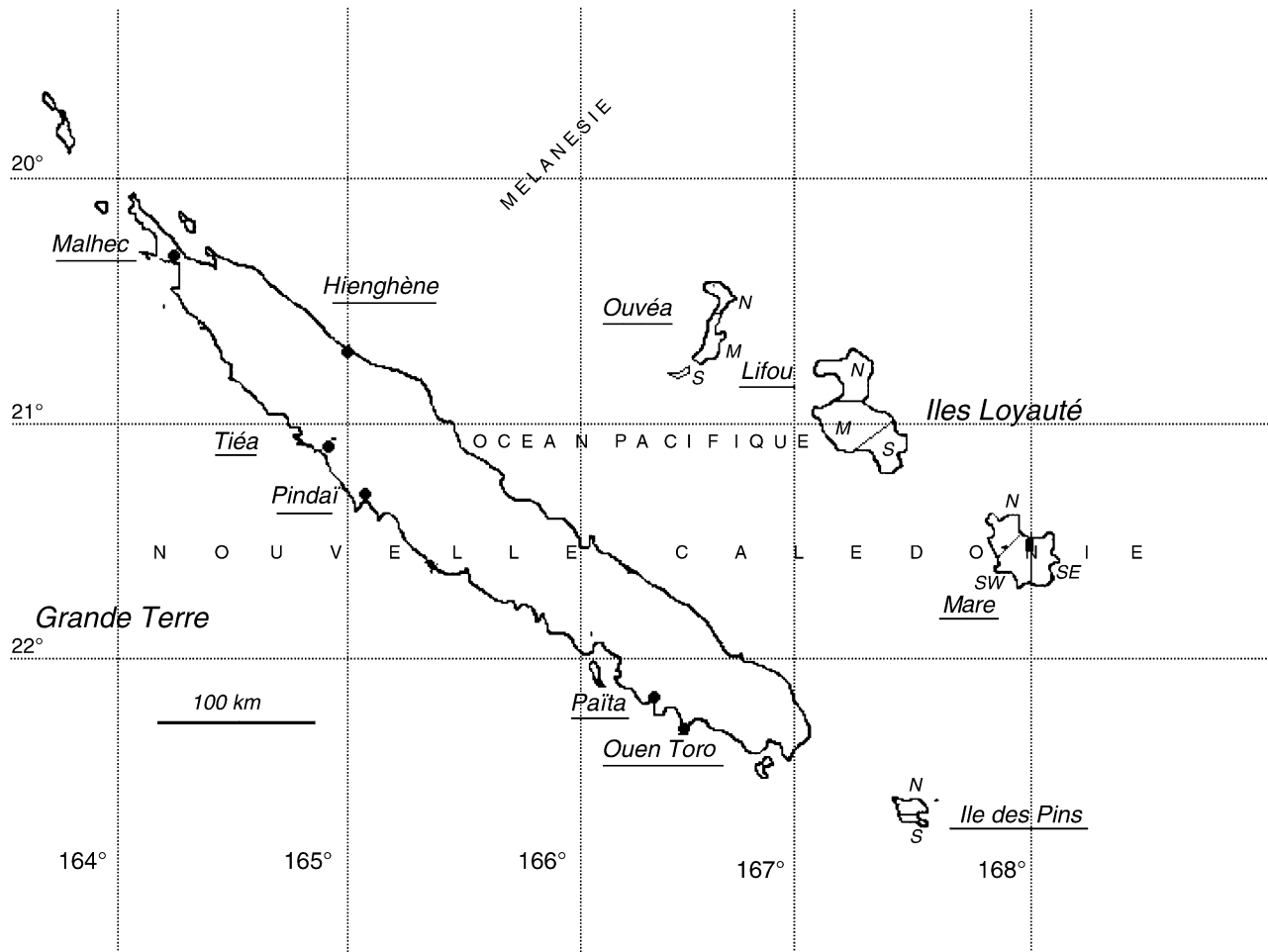


Fig. 1 Sampling sites of *Santalum austrocaledonicum*. N, North; M, Midlands; S, South; E, East; W, West.

runs the risk of collecting the same genetic individuals. In order to avoid this problem we excluded from the following analyses all individuals (but one) with the same genotypes that were less than 100 m apart. We first identified similar genotypes by constructing neighbour-joining (NJ) trees for each population with Darwin 4.4 (Perrier & Jacquemoud-Collet 2003). We then examined their localization on geographical maps where we had placed all the individuals using MAPINFO software. Out of 541 individuals, about 100 were eliminated this way, suggesting that suckering occurs frequently. The total number of individuals analysed per population is presented in Table 1.

#### Analysis of genetic diversity and departure from random mating

Allele frequencies, observed number of alleles per locus ( $A$ ), observed heterozygosity ( $H_O$ ) and expected heterozygosity ( $H_E$ ) (Nei 1978) per population were computed with GENETIX 4.03 (Belkhir *et al.* 2001).

The inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) was estimated for each

population and departure from Hardy–Weinberg equilibrium was assessed also using GENETIX 4.03 by a permutation test with 5000 permutations.  $P$  values were corrected using sequential Bonferroni procedure (Rice 1989).

To check if the differences in sample sizes and the various spatial scales over which individuals were pooled into ‘populations’ affected the diversity estimates, we calculated the allelic richness per population and island taking into account the dependence on sample size with an adaptation of the rarefaction index of Hurlbert (1971) (El Mousadik & Petit 1996), named ‘ $R$ ’, using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). The principle is to estimate the expected number of alleles in a subsample of  $2n$  genes, given that  $2N$  genes have been sampled ( $N > n$ ). In FSTAT,  $n$  is fixed as the smallest number of individuals typed for a locus in a sample.

#### Analyses of population differentiation

Differentiation among all samples and all sample pairs was tested using probability tests (Fisher exact tests), as described by Raymond & Rousset (1995). Wright’s

Population	No. of individuals	Sampling area [island size] (km <sup>2</sup> )	Latitude	Longitude
Ouen Toro	22	0.19	22°30'	166°45'
Pindai	26	3.43	21°31'	164°96'
Malek	37	0.87	20°19'	164°10'
Paita	53	0.67	22°09'	166°22'
Hienghène	20	0.57	20°43'	164°55'
Tiéa	10	0.05	21°08'	164°56'
<b>Grande Terre</b>	<b>168</b>	<b>5.8 [16 350]</b>		
IP north	26	32.25	22°35'	167°28'
IP south	35	25.25	22°39'	167°28'
<b>Ile des Pins</b>	<b>61</b>	<b>57.5 [152]</b>		
Lifou north	36	275.28	20°42'	167°13'
Lifou middle	42	271.81	20°58'	167°04'
Lifou south	15	96.95	21°01'	167°22'
<b>Lifou</b>	<b>93</b>	<b>644 [1196]</b>		
Mare northwest	21	125.32	21°24'	167°52'
Mare southwest	18	118.91	21°35'	167°53'
Mare East	22	89.18	21°33'	168°05'
<b>Maré</b>	<b>61</b>	<b>333.4 [650]</b>		
Ouvea north	21	45.87	20°27'	166°36'
Ouvea middle	15	21.40	20°38'	166°34'
Ouvea south	12	20.58	20°43'	166°25'
<b>Ouvéa</b>	<b>48</b>	<b>87.85 [132]</b>		

**Table 1** Characteristics of the populations of *Santalum austrocaledonicum* in the archipelago of New Caledonia: number of individuals sampled (no. of individuals), sampling area (in Grande Terre individuals are aggregated in populations, whereas they are quite isolated in Loyauté islands), and geographical coordinates of the populations

$F_{ST}$ -statistics  $F_{ST}$  (Wright 1951) were estimated for all populations and all population pairs by a 'weighted' analysis of variance (Cockerham 1973; Weir & Cockerham 1984) with GENEPOP. To investigate the genetic structure of populations, we ran an analysis of molecular variance using ARLEQUIN (Schneider *et al.* 2000) with 1000 permutations (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) which tests a particular genetic structure by partitioning the total variance into covariance components due to intraindividual differences, interindividual differences, and/or interpopulation differences. We tested two kinds of structure: among island and among populations within each island. We also tested the differentiation between the 'Grande Terre and Ile des Pins' group and the 'Ile Loyauté' group.

To relate the dispersal ability of *S. austrocaledonicum* to its geographical distribution, we ran Mantel tests (Mantel 1967) implemented in GENEPOP 3.4. The procedure assesses the significance of the correlation between pairwise  $F_{ST}/(1 - F_{ST})$  estimates and the logarithm of the Euclidian distance (in kilometres) between pairs of localities (Rousset 1997), with the Spearman rank coefficient as statistical test, using 5000 random permutations of the matrix. Two tests were used: between populations in Grande Terre and Ile des Pins, and between populations of Iles Loyauté.

Pairwise genetic distances between pairs of populations were computed using Cavalli-Sforza's chord measure (Cavalli-Sforza & Edwards 1967), obtained from the GENDIST

program (PHYLIP, version 3.6, Felsenstein 1989, 1993). The distance tree was constructed using the NJ method of Saitou & Nei (1987) using the NEIGHBOR program of PHYLIP. The robustness of each node was evaluated by bootstrapping data over locus for 1000 replications using the SEQBOOT program of PHYLIP 3.6 and the consensus tree obtained by SEQBOOT (PHYLIP 3.6) was displayed with TREEVIEW software (Page 1996).

## Results

### *Within-population genetic diversity and departure from random mating*

The eight microsatellite loci were polymorphic and the number of alleles per locus ranged from 3 for *mSaCIRG01* to 33 for *mSaCIRG10*. Mean numbers of alleles per locus per population ( $A$ ) ranged from 1.38 in Maré South-east (allelic richness or  $R$  in this population: 1.19) to 7.88 in Ile des Pins North ( $R$ : 5.14). Forty-two alleles were private, the largest number in one population being 9 in Ile des Pins North. The Pearson correlation coefficient between the number of alleles per locus ( $A$ ) and the allelic richness corrected with a rarefaction index ( $R$ ) (Table 2) was 0.96 and was highly significant (Spearman correlation coefficient: 0.935\*\*\*), which demonstrated a strong relationship between these two parameters.

Population	No. of individuals	A	R	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
Ouentoro	22	5.13	4.11	0.66 (0.11)	0.65 (0.12)	0.0 ns
Pindai	26	7.5	5.28	0.66 (0.23)	0.72 (0.20)	0.09***
Malek	37	6.25	4.46	0.69 (0.23)	0.66 (0.21)	-0.02 ns
Paita	53	6.75	3.93	0.61 (0.17)	0.62 (0.17)	0.03***
Hienghene	20	5.25	3.92	0.64 (0.19)	0.59 (0.12)	-0.05 ns
Tiea	10	6.25	5.53	0.75 (0.22)	0.70 (0.22)	-0.03 ns
<b>Grande Terre</b>	<b>168</b>	<b>16</b>	<b>11.44</b>	<b>0.69 (0.16)</b>	<b>0.79 (0.18)</b>	<b>0.17***</b>
Ile des Pins N	26	7.88	5.14	0.74 (0.14)	0.71 (0.15)	-0.01 ns
Ile des Pins S	35	7.63	4.85	0.69 (0.20)	0.67 (0.20)	-0.01 ns
<b>Ile des Pins</b>	<b>61</b>	<b>10.25</b>	<b>8.82</b>	<b>0.74 (0.19)</b>	<b>0.71 (0.17)</b>	<b>0.0 ns</b>
Lifou N	36	2.75	2.20	0.25 (0.22)	0.33 (0.25)	0.27***
Lifou M	42	4.13	2.62	0.32 (0.20)	0.40 (0.22)	0.21**
Lifou S	15	2.13	1.87	0.25 (0.26)	0.25 (0.26)	0.06 ns
<b>Lifou</b>	<b>93</b>	<b>4.5</b>	<b>3.87</b>	<b>0.40 (0.30)</b>	<b>0.42 (0.21)</b>	<b>0.25***</b>
Mare N	21	1.75	1.40	0.02 (0.04)	0.07 (0.13)	0.67***
Mare SW	18	1.38	1.37	0.06 (0.13)	0.12 (0.24)	0.47*
Mare SE	22	1.38	1.19	0.01 (0.02)	0.03 (0.06)	0.66*
<b>Mare</b>	<b>61</b>	<b>2</b>	<b>1.83</b>	<b>0.16 (0.35)</b>	<b>0.14 (0.21)</b>	<b>0.62***</b>
Ouvea N	21	2.88	2.21	0.23 (0.19)	0.28 (0.22)	0.21**
Ouvea M	15	2.5	2.09	0.3 (0.25)	0.28 (0.22)	-0.03 ns
Ouvea S	12	2.37	2.13	0.28 (0.26)	0.29 (0.23)	0.10 ns
<b>Ouvea</b>	<b>48</b>	<b>3.63</b>	<b>3.46</b>	<b>0.39 (0.28)</b>	<b>0.37 (0.17)</b>	<b>0.14*</b>
<b>Total</b>	<b>431</b>	<b>15.37</b>	<b>15.31</b>	<b>0.45 (0.10)</b>	<b>0.66 (0.19)</b>	<b>0.33***</b>

**Table 2** Summary of genetic diversity estimates obtained with eight nuclear microsatellites for *Santalum austrocaledonicum*. Results presented for each population and each island

No. of individuals; A, number of alleles per locus;  $H_O$ , observed heterozygosity;  $H_E$ , expected heterozygosity;  $F_{IS}$ , fixation index; R, corrected allelic richness. N, North; M, Midlands; E, East; W, West; S, South.

P values: ns;  $P > 0.05$ , \*;  $P < 0.05$ , \*\*;  $P < 0.01$ , \*\*\*;  $P < 0.001$  (P values were adjusted using sequential Bonferroni procedure).

Considering each locus in each population separately, the distribution of allele frequencies was highly unbalanced (results not shown). In 67% of the situations, one allele presented a frequency higher than 0.5.

Observed and expected (in parenthesis) heterozygosity values ranged from 0.01 (0.03) in Maré southeast up to 0.74 (0.74) in Ile des Pins North. The pattern of variation for A and  $H_O$  differed among populations within each island (Table 2). For instance within Grande Terre, the mean number of allele varied from 5.13 to 7.5 and mean observed (respectively expected) heterozygosity from 0.61 (0.62) to 0.75 (0.72). Concerning Hardy–Weinberg equilibrium, all results per population are given in Table 2.

A significant heterozygote deficit was detected in each island except Ile des Pins.  $F_{IS}$  values varied widely among islands, ranging from 0.14 in Ouvéa to 0.62 in Maré. Within islands, significant  $F_{IS}$  values after Bonferroni correction were all positive and varied weakly among populations.

#### Analyses of population differentiation

All  $F_{ST}$  values were significant.  $F_{ST}$  was 0.22 among islands and 0.35 among populations (Table 3). Between the two groups 'Grande Terre – Ile des Pins' and 'Iles Loyauté', the

$F_{ST}$  was 0.24 and in this case  $F_{ST}$  was 0.39 among populations. Global  $F_{ST}$  among populations within islands was 0.12, it was around 0.20 within Grande Terre and Maré, around 0.07 within Lifou and Ouvéa and around 0.01 within Ile des Pins. All pairwise  $F_{ST}$  values were significant at the level  $\alpha = 0.05$  except for the pair Maré north and Maré southeast ( $F_{ST} = 0.01$ ,  $P = 0.19$ ) and for the pair Ile des Pins North and South ( $F_{ST} = 0.02$ ,  $P = 0.10$ ) (Table 3).

Populations from Grande Terre and Ile des Pins and from Iles Loyauté were separated by the NJ tree (Fig. 2), and populations of Ile des Pins were clearly related to the group of populations of Grande Terre. The populations of Lifou had an intermediate position between the populations of Maré, Ouvéa and Grande Terre. The populations of the north of Grande Terre (Malek and more specially Hienghène) were closer to Iles Loyauté than the other Grande Terre populations.

Mantel tests revealed a significant correlation between geographical and genetic distances considering all the populations ( $r = 0.31$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3a). There was a significant association among Iles Loyauté populations ( $r = 0.65$ ,  $P < 0.001$ ) and among Grande Terre populations ( $r = 0.6$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3b). When Ile des Pins was included in the model with Iles Loyauté or with Grande Terre, the coefficient was not significant ( $P > 0.05$  in both cases).

**Table 3** Results of the AMOVA testing the genetic structure among islands, among two groups ('Grande Terre-Ile des Pins' and 'Iles Loyauté') and among population within islands. For each analysis, we figured the percentage of the total differentiation attributable to the variation among groups (if there are some), among populations and within populations. Moreover, we figured the  $F_{ST}$  between population within island

Group	Source of variation	d.f.	Percentage of variation	$F_{ST}$
Among islands	Among islands	4	22.11	0.35****
	Among populations within islands	12	12.36‡	
	Within populations	845	65.53	
	Total	861		
Between 'Grande Terre-Ile des Pins' and 'Iles Loyauté' groups	Among groups	1	23.58	0.39****
	Among populations within groups	15	15.47‡	
	Within populations	845	60.96	
	Total	861		
Within Grande Terre	Among populations	5	19.51	0.20***
	Within populations	330	80.49	
	Total	335		
Within Ile des Pins	Among populations	1	1.36	0.01***
	Within populations	120	98.64	
	Total	121		
Within Mare	Among populations	2	19.77	0.2***
	Within populations	119	80.23	
	Total	121		
Within Lifou	Among populations	2	6.69	0.07***
	Within populations	183	93.31	
	Total	185		
Within Ouvea	Among populations	2	6.68	0.07***
	Within populations	93	93.32	
	Total	95		

†The  $F_{ST}$  represents the differentiation among populations within the total population.

‡The percentage represents the differentiation among populations within island (group).

## Discussion

### Diversity

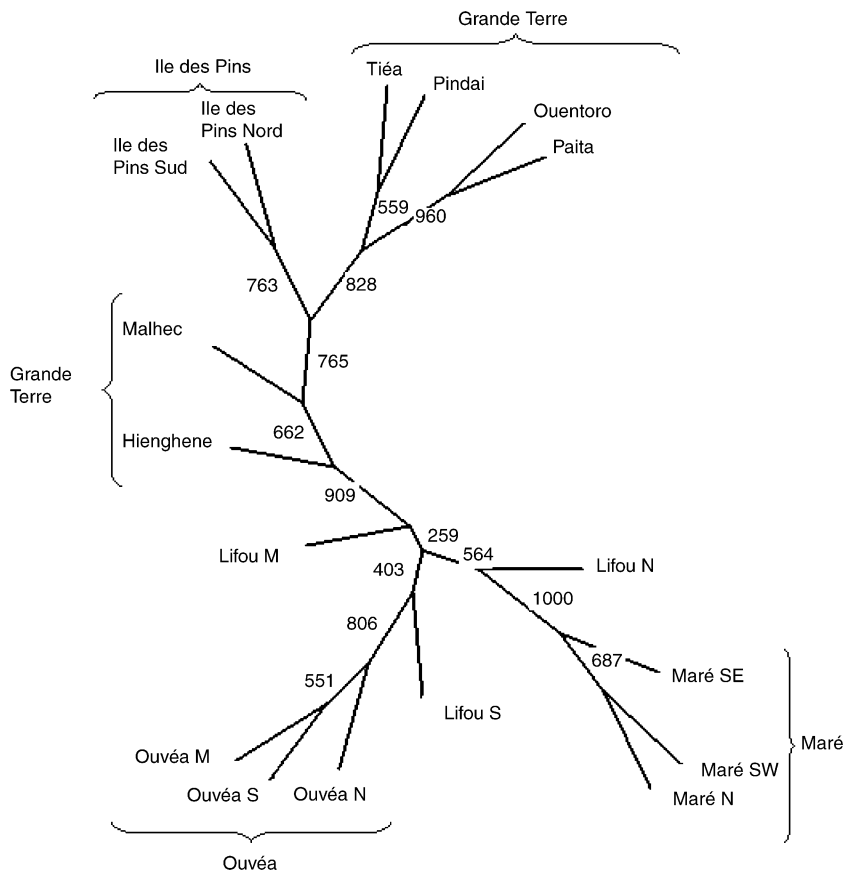
In this study we used different parameters to assess genetic diversity. The parameters using the number of alleles ( $A$  and  $R$ ) are complementary of those using allele frequencies ( $H$ ), specially for analyses raising conservation issues (El Moussadik & Petit 1996). Here we used the allelic richness corrected by the rarefaction index ( $R$ ) to take into account the differences in sample size of the populations (from 10 to 53 individuals). Our result showed a very high correlation between  $A$  and  $R$  (Pearson coefficient: 0.96, Spearman coefficient: 0.935) demonstrating that the correction with the rarefaction index has no effect on diversity assessment. This also suggests that rare alleles (which strongly influence measures of allelic richness) have not a more scattered distribution than the other alleles.

Many tree species exhibit regional structuring (Morand *et al.* 2002), particularly when gene flow is limited by barriers such as mountains or oceans. Our analysis confirmed this principle, as it revealed great differences in diversity parameters between islands throughout the archipelago. The broad range in observed heterozygosity ( $H_O$ ) values

resulted from the broad variation in the mean number of alleles per locus ( $A$ ) and follows the pattern found in other microsatellite studies of tropical tree species. For example, Dayanandan *et al.* (1999) found  $A$  values between 2 and 15, and  $H_O$  values between 0.13 and 0.93 in *Carapa guianensis*.

Our diversity parameters ( $A = 2-16$ , mean = 15.37;  $H_E = 0.14-0.79$ , mean = 0.66) were comparable to those of other tree species analysed with microsatellites. They were higher than those of *Vitellaria paradoxa* ( $A = 3.4-4.2$ ,  $H_E = 0.38-0.44$ ) (Kelly *et al.* 2004), *Vouacapoua americana* ( $A = 3.2-5.1$ ,  $H_E = 0.34-0.52$ ) (Dutech *et al.* 2004), *Grevillea macleayana* ( $A = 3.2-4.2$ ,  $H_E = 0.42-0.53$ ) (England *et al.* 2002), and lower than those of *Melaleuca alternifolia* ( $A = 20-27$ ,  $H_E = 0.13-0.92$ ) (Rossetto *et al.* 1999) and *Symphonia globulifera* (mean  $A = 3.7-16$ , mean  $H_E = 0.67-0.85$ ) (Aldrich *et al.* 1998).

Populations of Iles Loyauté had a lower genetic diversity, particularly Maré (mean observed heterozygosity  $H_O = 0.156$ , mean number of alleles  $A = 2$ ), compared to Ile des Pins ( $H_O = 0.74$ ,  $A = 10.25$ ) and Grande Terre ( $H_O = 0.69$ ,  $A = 16$ ). Genetic variability was not correlated positively with population size ( $r = -0.47$ , not significant with a two-tailed Pearson correlation test with  $\alpha = 0.05$ :  $P > 0.025$ ), it was lower in Iles Loyauté than in Grande Terre and Ile des Pins (for example, mean number of allele per locus per km<sup>2</sup>



**Fig. 2** Neighbour-joining phylogram based on the Cavalli-Sforza chord method for *Santalum austrocaledonicum*. Ile des Pins 1 = North, 2 = South; Lifou and Ouvéa 1 = North, 2 = Midlands, 3 = South; Maré 1: Northwest, 2 = Southwest, 3 = Southeast.

was 0.006 in Maré and 2.16 in Grande Terre). The higher genetic diversity in Grande Terre can be related to its higher number of populations and its larger area. But it can also simply result from the history of sandalwood colonization throughout the archipelago. Grande Terre and Ile des Pins are the most ancient islands of the archipelago and in major part comprise sedimentary and volcanic formations from the Permian (225–280 million years ago) to the Tertiary (1.5–65 Ma). Their same geological origin and their connection during the last glaciation between 14 000 and 9000 years BP (Stevenson *et al.* 2001) could explain their similarity concerning genetic diversity, which is also reflected by their proximity in the genetic tree. The Eastern arc of the Iles Loyauté rests on old volcanoes, that were gradually drowned under the sea, whereas the coral grew in height, forming a ring which evolved into an atoll when the volcanic island disappeared under the sea. In the Quaternary period (1.8 Ma) these filled lagoons were raised, giving the current limestone islands (Picard 1999).

Given the different ages of the islands, it is very likely that sandalwood arrived first on Grande Terre and Ile des Pins, then differentiated into the species *Santalum austrocaledonicum*, and then colonized the Loyautés. Frankham (1997) established comparisons between mainland and island diversity of many organisms, and found that in most cases mainland populations were more diverse. Given their

large size, Grande Terre and Ile des Pins can be likened to mainland, and lower diversity in the Iles Loyauté can be explained by the island colonization process and restricted gene flow.

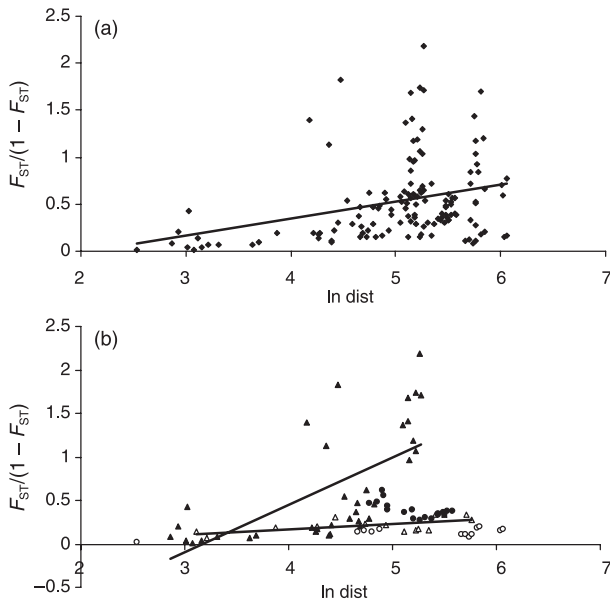
The very low diversity in Mare ( $A = 2$ ,  $H_E = 0.14$ ) can be explained by a stepping-stone model (Kimura & Weiss 1964) if we consider that there was no colonization from the east side of Grande Terre to the Iles Loyauté, and that there was two paths of colonization, one from north Grande Terre to Ouvéa then Lifou, and then Maré, the other from south Grande Terre and Ile des Pins to Maré. Hence Maré could be the end of the path and would have received less genetic diversity.

#### Heterozygote deficit

Our study revealed a strong heterozygote deficit in each island, and high values of  $F_{IS}$  particularly in Iles Loyauté. At least four explanations may account for this deficit.

The first is the occurrence of null alleles (alleles that are never amplified because of mutations in the flanking primer sequences (Callen *et al.* 1993)). This could explain the departure from Hardy–Weinberg equilibrium of loci *mSaCIRE09*, *mSaCIRG10* and *mSaCIRF04*. But this seems unlikely because amplification failures that would reflect null/null homozygotes were rare (maximum of 5.6% for





**Fig. 3** Relationship between genetic differences [ $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ] and geographical distances for (a) all populations pairs ( $r = 0.31$ ), and (b) pairs of populations of Iles Loyauté only (black triangles) (significant relationship,  $r = 0.65$ ), pairs of populations of Grande Terre only (open triangles) (significant relationship,  $r = 0.60$ ), pairs of populations of Ile des Pins and Loyauté (each part of the pair being a population of Ile des Pins, the other being a population of Loyauté) (black dots) (not significant) and pairs of populations of Ile des Pins and Grande Terre (each part of the pair being a population of Ile des Pins, the other being a population of Grande Terre) (open dots) (not significant).

locus G-10). One means to test their absence would be to design sets of new primers located upstream and downstream from the original ones, to see if the individuals previously scored as homozygote remain as such when using the new primers, as did Gibbs *et al.* (1997). We decided not to search for null alleles as the analyses gave similar results with and without the three loci previously mentioned.

A second explanation is the Wahlund effect, which occurs when a subdivided population contains fewer heterozygotes than predicted despite the fact that all subdivisions are in Hardy–Weinberg equilibrium. This effect may explain a part of the heterozygote deficit of the whole island population. For example, Ouvéa shows a high and significant  $F_{IS}$  (0.14\*) (high heterozygote deficit), but when divided into three populations, two of them do not show heterozygote deficit (Ouvéa Midland  $F_{IS} = -0.03$  ns, Ouvéa South  $F_{IS} = 0.1$  ns). Similarly, in Grande Terre ( $F_{IS} = 0.17^{***}$ ), in which populations are more isolated, all populations but Pindai ( $F_{IS} = 0.09^*$ ) showed no significant departure from panmixia.

Two characteristics of *S. austrocaledonicum* may contribute to the creation of a Wahlund effect. First, the suckering from adventitious buds on roots following disturbance,

which has permitted sandalwood to subsist after the dramatic cuttings in the 19th century and the frequent fires in the archipelago. This asexual way of reproduction leads to clones in a small perimeter. We clearly observed this phenomenon throughout the archipelago, as close individuals often had the same genotype (cf. Material and methods). Mating among individuals belonging to the same clone is akin to selfing, and will similarly create departure from Hardy–Weinberg expectations.

Second, a low seed and/or pollen dispersal can create a clustering of genetically related trees around a mother tree. This is the case for *Vouacapoua americana* (Dutech *et al.* 2004) whose seeds are heavy (around 30 g) and dispersed by small rodents which bury them usually less than 10 m from their source. Unlike *V. americana*, *S. austrocaledonicum*'s seeds are not very large (8 mm  $\times$  5 mm) so they can easily be disseminated by birds over large distances. However, if pollinators are lacking, it is very likely that trees reproduce by selfing. Selfing will also happen when tree density is low and pollinators tend to stay on the same tree. Selfing seems to be the most logical explanation for heterozygote deficiency in situations such as Maré where mean observed heterozygosity is extremely low,  $F_{IS}$  is very strong and significant (0.62), and subdivision of the island into three populations does not improve the results ( $F_{IS}$  all significant and around 0.5).

The Wahlund effect can be not only spatial but also temporal (Morand *et al.* 2002): when flowering dates are consistently different among trees, as with *S. austrocaledonicum*, reproduction is restricted to the individuals flowering at the same time, hence creating a cluster of trees. However, this hypothesis assumes that 'populations' of trees flowering at the same time keep the same flowering dates from one year to another and are of finite size. Moreover, it supposes that these populations have evolved different allelic frequencies at microsatellite loci, or that there was an initial disequilibrium between neutral markers and loci involved in homogamy that are affected by a heterozygote deficit.

#### *Differentiation between populations*

The degree of differentiation between populations is both influenced by drift, which increases differentiation, and gene flow, which reduces it. Gene flow through pollen is expected to be low in *S. austrocaledonicum* as it is insect-pollinated, but seed dispersal through bird ingestion can occur over long distances and may allow gene flow between islands.

Both  $F_{ST}$  values and percentage of variance obtained with the AMOVA indicated a strong differentiation between islands ( $F_{ST} = 0.22^{***}$ ) and a lower differentiation between populations within island (intra island  $F_{ST} = 0.16$  representing 12% of the total variance). This result was expected in an island system, where ocean barriers limit gene flow

between populations (MacArthur & Wilson 1967), and confirms the first results obtained for tree species with similar geographical patterns, for example *Pterocarpus officinalis*, which revealed a strong differentiation between islands with AFLP markers (Rivera-Ocasio *et al.* 2002).

As expected with the isolation of its populations, Grande Terre had a high  $F_{ST}$  (0.2\*\*\*). The high  $F_{ST}$  value in Maré (0.2\*\*\*) was harder to explain, but the possible more inbred mating system in this island may have influenced the calculation as effective size is reduced in selfing populations.

Because of its large size, Grande Terre was the most suitable island for comparisons of population structure with continental species.

Our within-island results are similar to those of *Santalum spicatum* which had an  $F_{ST}$  of 0.09 (Byrne *et al.* 2003), but the markers used for this analysis were RFLP, which may affect the result compared to what would be obtained with microsatellites, RFLP marker mutation rate being lower than that of microsatellite markers.

To our knowledge, there is no study of continental tree species using microsatellites with similar patterns of dispersal. The majority of trees studied are insect pollinated, but have seed dispersal over small distances from the mother tree [barochorous, zoochorous (by small animals), or anemochorous over a small distance], so their gene flow is potentially lower than that of species dispersed by birds, hence their  $F_{ST}$  is expected to be higher. However, examples of those tree species studied on a similar geographical scale showed a lower differentiation than on Grande Terre: with *Caryocar brasiliense*, Collevatti *et al.* (2001) found an  $F_{ST}$  of 0.11 and *Swietenia macrophylla* exhibited a  $F_{ST}$  of 0.1 in the Brazilian Amazon (Lemes *et al.* 2003), and 0.11 in Central America (Novick *et al.* 2003). This result indicates that gene flow in *S. austrocaledonicum* on Grande Terre is lower than expected considering its large dispersal distance.

The tree representing genetic distances between populations confirmed the emergence of two distinct groups: Iles Loyauté and Grande Terre/Ile des Pins. Ile des Pins populations were genetically very close to Grande Terre ones, as already suspected from their geographical connectivity during the last glaciations (Stevenson *et al.* 2001), but could be explained simply by their geographical proximity.

The case of Hienghène is interesting, as it is the only known population on the east coast of Grande Terre. First, our analysis revealed that it was the genetically closest to Iles Loyauté, which suggests a genetic exchange between them, probably through birds. Second, Grande Terre island is crossed from north to south by a chain of mountains, which constitutes a geographical barrier to gene flow, given that *S. austrocaledonicum* only occurs at low altitudes. That obstacle may explain the genetic isolation between western and eastern populations. Finally, it is known that Caledonian sandalwood exploitation, which reached its peak in the 1850s, concerned all the Iles Loyauté and the

eastern part of Grande Terre. Thus, Hienghène may be a remnant of a larger number of populations, decimated by human exploitation, the witness of a past gene flow between the east coast of Grande Terre and the Iles Loyauté.

Our results indicate that *S. austrocaledonicum* populations are differentiated by a process of isolation by distance. This hypothesis is supported by a significant Mantel test ( $r = 0.31^*$ ) between a matrix of pairwise  $F_{ST}$  and a matrix of geographical distances. Ile des Pins showed no isolation by distance with the Loyautés nor with Grande Terre to which it is very close. This points out the absence of current gene flow between Ile des Pins and South Grande Terre.

#### Conservation implications

*Santalum austrocaledonicum* is threatened throughout its natural range as a result of two waves of over-exploitation, the first after the discovery of New Caledonia in the 1840s by Edouard Foxhall du Camden which led to shortage in 1865, the second at the end of 19th century. It is only since 1988 that cuttings have been regulated and new trees planted.

Our study provides tracks that could help to design conservation and management policies to maintain the diversity of this valuable species. Both the high level of genetic variation within populations and the isolation by distance suggest that *in situ* conservation strategies, like the creation of reserves, could be designed to preserve large areas to minimize the loss of diversity due to genetic drift, and to conserve maximally the regional genotypic diversity.

Our study allows us to define two molecular ESUs (evolutionary significant units, Ryder 1986) that we can consider as provenance zone (in the forestry sense) for *S. austrocaledonicum*: 'Grande Terre and Ile des Pins' and 'Iles Loyauté', which are differentiated by an  $F_{ST}$  of 0.24. The term ESU was devised in a practical way to approach the conservation of genetic resources, given the broad recognition of the importance of genetic diversity in conservation policy and the frequent inadequacy of existing taxonomy to describe it (Moritz 1994). The criterion for identification of an ESU has been defined as reciprocal monophyly for organelle haplotypes and significant divergence of allele frequencies at nuclear loci (Moritz 1994). Crandall *et al.* (2000) have pointed out that ESUs based on neutral molecular criteria will not address many of the real problems of conservation. Ecological factors, such as frequency-dependent mating and pollinator interactions, must also be taken into account. It is likely that the best strategy lies in concordance between neutral genetic and adaptive information (Moritz 2002) but, as a starting point, identification of molecular ESUs provides a valuable practical framework (Cavers *et al.* 2003). The study of the genetic diversity of chloroplast microsatellites we are now conducting on *S. austrocaledonicum* will permit us to define these molecular ESUs.

## Acknowledgments

We would like to thank Alexandre Vaillant and Pierre Sire for laboratory work and Alexandre Lagrange for field work in New Caledonia. Many thanks go to IAC (Institut Agronomique néo-Calédonien) and to the Development Services of the Provinces of Islands, North and South. We also acknowledge MEED (Ministère de L'Ecologie et du Développement Durable) for financial support.

## References

- Aldrich PR, Preston R, Hamrick JL, Chavarriga P, Kochert G (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, **7** (8), 933–944.
- Barton NH (1989) Founder effect speciation. In: *Speciation and Its Consequences* (eds D Otte, JA Endler), pp. 229–256. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2001) GENETIX 4.03, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Bottin L, Vaillant A, Sire P, Cardic C, Bouvet JM (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Santalum austrocaledonicum*, Santalaceae. *Molecular Ecology Notes* (in press).
- Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forestry Research*, **20**, 254–257.
- Brauner S, Crawford DJ, Stuessy TF (1992) Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *American Journal of Botany*, **79**, 1436–1439.
- Byrne M, MacDonald B, Broadhorst L, Brand J (2003) Regional genetic differentiation in Western Australian sandalwood (*Santalum spicatum*) as revealed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 1208–1214.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y *et al.* (1993) Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, **7**, 922–927.
- Carlquist S (1980) *Hawaii: A Natural History. Geology, Climate, Native Flora and Fauna Above the Shoreline*, 2nd edn. Pacific Tropical Botanical Garden, Lawa'i Hawaii.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution*, **32**, 550–570.
- Cavers S, Navarro C, Lowe AJ (2003) A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics*, **4**, 571–580.
- Cockerham CC (1973) Analysis of gene frequencies. *Genetics*, **74**, 679–700.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Day JD (2001) Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 349–356.
- Cox PA, Elmqvist T, Pierson ED, Rainey WE (1991) Flying foxes as strong interactors in South Pacific islands ecosystems: a conservation hypothesis. *Conservation Biology*, **5**, 448–454.
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 290–295.
- Crawford DJ, Stuessy TF, Lammers TG, Silva OM, Pacheco P (1990) Allozyme variation and evolutionary relationships among three species of *Wahlenbergia* (Campanulaceae) in the Juan Fernandez Islands. *Botanical Gazette*, **151**, 119–124.
- Crawford DJ, Stuessy TF, Silva OM (1987) Allozyme divergence and the evolution of *Dendroseris* (Compositae: Lactuceae) on the Juan Fernandez Islands. *Systematic Botany*, **12**, 435–443.
- Crawford DJ, Stuessy TF, Silva OM (1988) Allozyme variation in *Chenopodium santae-clare*, an endemic of the Juan Fernandez Islands, Chile. *Biochemical and Systematic Ecology*, **16**, 279–284.
- Darwin C (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection* (reprint of 1st edn 1950). Watts, London.
- Dayanandan S, Dole J, Bawa K, Kesseli R (1999) Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology*, **8**, 1585–1592.
- Dutech C, Joly HI, Jarne P (2004) Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guiana populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. *Heredity*, **92**, 69–77.
- Ehrhart Y (1998) Descriptions of some sandal tree populations in the Southwest Pacific: consequences for the silviculture of these species and provenances. In: *Proceeding for the International Seminar 'Santalum and its Products' Held on 18–19 December 1997*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832–839.
- Elisens WJ (1992) Genetic divergence in *Galvezia* (Scrophulariaceae). evolutionary and biogeographic relationships among South American and Galapagos species. *American Journal of Botany*, **79**, 198–206.
- Ellstrand N, Elam D (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 217–242.
- Emerson BC (2002) Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and processes. *Molecular Ecology*, **11**, 951–966.
- England P, Phillip R, Usher, Annette V, Whelan, Robert J., Ayre, David J (2002) Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. *Molecular Ecology*, **11** (6), 967–977.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Felsenstein J (1993) *PHYLIP: Phylogenetic inference package, Version 3.573c*. University of Washington, Seattle, WA.
- Frankham R (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, **78**, 311–327.
- Gibbs D, Barnes E, Cox J (2001) *Pigeons and Doves: A Guide to the Pigeons and Doves of the World*. Pica Press, Sussex.
- Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ, Johnson G (1997) Genetic structure of populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, **6**, 1123–1132.
- Goudet J (1995) FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Gustafsson S (2000) Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology*, **9**, 1863–1872.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **351**, 1291–1298.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, **95**, 124.

- Hurlbert SH (1971) The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, **52**, 577–586.
- Kelly B, Hardy O, Bouvet JM (2004) Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular Ecology*, **13**, 1231–1240.
- Kimura M, Weiss GH (1964) The stepping-stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561–576.
- Kwon JA, Morden CW (2002) Population genetic structure of two rare tree species (*Colubrina oppositifolia* and *Alphitonia ponderosa*, Rhamnaceae) from Hawaiian dry and mesic forests using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology*, **11**, 991–1001.
- Lemes MR, Gribel R, Proctor J, Grattapaglia D (2003) Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implication for conservation. *Molecular Ecology*, **12**, 2875–2883.
- MacArthur RH, Wilson EO (1967) *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Malécot V, Nickrent DL, Baas P, van den Oever L, Lobreau-Callen D (2004) A morphological cladistic analysis of Olacaceae. *Systematic Botany*, **29**, 569–586.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- Morand M-E, Brachet S, Rossignol P, Dufour J, Frascaria-Lacoste N (2002) A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology*, **11**, 377–385.
- Moritz C (1994) Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, **9**, 373–375.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238–254.
- Nasi R, Ehrhart Y (1996) Le santal un parfum de prospérité. 1ère partie — une longue histoire. *Bois et Forêts Des Tropiques*, **247**, 5–19.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Newman D, Pilson D (1997) Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution*, **51**, 354–362.
- Novick RR, Dick CD, Lemes MR, Navarro C, Caccone A, Bermingham E (2003) Genetic structure of Mesoamerican population of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **12**, 2885–2893.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357–358.
- Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC Ed, *Genetic diversity of cultivated tropical plants* Enfield, Science Publishers Montpellier pp. 43–76.
- Picard M (1999) L'archipel. *Néo-Calédonien*. Centre de Documentation Pédagogique Nouvelle-Calédonie, Nouméa.
- Quémin C (1988) Etudes sur le Santal. (*Santalum Austrocaledonicum*). *Mémoire de 3<sup>ème</sup> année*. Ecole Nationale des Ingénieurs de Travaux des Eaux et Forêts.
- Radomiljac AM, McComb JA (1997) Nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing woody host influences on the growth of the root hemi-parasite *Santalum album* L. Sandal and its products. International Seminar, Bangalore, India, 18–19 December 1997. *ACIAR Proceedings*, **84**, 54–57.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 3.2a): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Rivera-Ocasio E, Aide TM, McMillan MO (2002) Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Molecular Ecology*, **11**, 675–683.
- Rossetto M, Slade RW, Baverstock PR, Henry RJ, Lee LS (1999) Microsatellite variation and assessment of genetic structure in a tea tree (*Melaleuca alternifolia* — Myrtaceae). *Molecular Ecology*, **8**, 633–643.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219–1228.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology & Evolution*, **1**, 9–10.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406–425.
- Savolainen O, Kuittinen H (2000) Small population processes. In: *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice* (Young A, Boshier D, Boyle T), pp. 91–100, CABI Publishing, United Kingdom.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis. User manual version 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland. Free program distributed by the authors over internet from lgb.unige.ch/arlequin/
- Sheely DL, Meagher TR (1996) Genetic diversity in Micronesian island populations of the tropical tree *Camptosperma brevipeptiolata* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*, **83**, 1571–1579.
- Stevenson J, Dobson JR, Prosser IP (2001) A late quaternary record of environmental change and human impact from New Caledonia. *Palaeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **168**, 97–123.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323–354.
- Young AG, Boyle T, Brown AHD (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 413–418.
- Young AG, Clarke GM (2000) *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

---

These results are part of Lorraine Bottin's PhD thesis on the analysis of genetic diversity of *Santalum austrocaledonicum*. This study was one of the tasks of the sandalwood project founded by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development involving Isabelle Olivieri working on evolutionary genetics at ISEM, University of Montpellier. Laboratory work and analyses were done in Forest Department of CIRAD where Jean-Marc Bouvet is the responsible of the 'Forest genetics' research unit. Daniel Verhaegen is a molecular biologist and Jacques Tassin is an ecologist positioned in New-Caledonia working in the same research unit.

---



## ***ANNEXE 4***

- Bottin L, Vaillant A, Sire P, Cardi C, Bouvet J M (2005) “Isolation and Characterization of microsatellite loci in *Santalum austrocaledonicum*, Santalaceae”, *Molecular Ecology Notes*, **5**(4), 800-802.



## PRIMER NOTE

# Isolation and characterization of microsatellite loci in *Santalum austrocaledonicum*, Santalaceae

L. BOTTIN, A. VAILLANT, P. SIRE, C. CARDI and J. M. BOUVET

Cirad-forêt, campus de Baillarguet TA 10C, 34398, Montpellier Cedex 5, France

**Abstract**

The forest tree *Santalum austrocaledonicum* is endemic to the archipelagos of New Caledonia and Vanuatu, and is threatened by the reduction of the populations due to exploitation. In order to investigate the genetic diversity and structure of this species, we developed eight pairs of primers for nuclear microsatellites. These loci were polymorphic in all the populations, with a mean of three to 33 alleles per locus.

*Keywords:* conservation, gene flow, insularity, nuclear microsatellites, population genetic structure, sandalwood

Received 15 March 2005; revision accepted 6 May 2005

*Santalum austrocaledonicum* is a forest tree species endemic to New Caledonia and Vanuatu. It has been one of the most exploited sandalwood species since the 19th century. Essential oils extracted from heartwood are used in medicine and the perfume industry. Still exploited, some populations are seriously threatened (Nasi & Ehrhart 1996). To implement a strategy of conservation and sustainable use of the species, it was decided to assess the genetic diversity and the structure of the populations in the New Caledonian archipelago. We chose nuclear microsatellite markers, which will also allow the assessment of the mating system and the gene flow between populations. No nuclear microsatellites have yet been identified in any sandalwood species. In this study, we report the development of microsatellite primers from *S. austrocaledonicum* and their polymorphism in the archipelago of New Caledonia, which comprises a large island named Grande Terre, three Loyauté Islands (Ouvéa, Maré and Lifou) and Ile des Pins island. A total of 431 individuals were sampled on the archipelago: 168 from six isolated populations of Grande Terre, 61 from Ile des Pins, 61 from Maré, 93 from Lifou and 48 from Ouvéa. The sampling was exhaustive in the populations of Grande Terre, except Ouen Toro, because they had only a small number of individuals. Elsewhere the populations were more densely populated and the sampling was random. Two to five leaves at the young-adult stage were collected on each tree and dried in a

plastic bag containing 30 g of silica gel. The leaves were then separated from silica gel and kept in our laboratory at room temperature.

Our genomic library was constructed using a DNA sample from an individual belonging to the Tiaoué area population, which is located in the middle of Grande Terre island on the West coast.

Total DNA was extracted from 100 mg of dry leaf material using a Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide (MATAB) method derived from Bousquet *et al.* (1990), with one additional chloroform–isoamyl alcohol (24:1) extraction. Three micrograms of this purified total DNA was used to construct a (GA)<sub>n</sub> and (CA)<sub>n</sub> repeat enriched genomic library, according to the Billote *et al.* (1999) protocol. A total of 43 clones were selected and sequenced using BigDye Terminator Cycle Sequencing chemistry (Applied Biosystems), and sequences were detected on an ABI 3700 sequencer. Thirty-two of the sequenced clones contained a microsatellite region with at least four uninterrupted repeats. After discarding duplicates, hybrid clones and clones with the microsatellite region too close to the edge of the sequence, 21 sequences were suitable for primer design and allowed a successful design using OLIGO 3 software. Six to eight individuals of different origins were used to test for polymorphism in these sequences. The screening protocol was the following: 15 ng of DNA were amplified by polymerase chain reaction in a 10- $\mu$ L volume containing 1 $\times$  buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs), 0.7  $\mu$ M of each primer, 15 ng of template DNA and 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen).

Correspondence: L. Bottin, Fax: +33 (0)467 5937 33; E-mail: bottin@cirad.fr



**Table 1** Development, screening and polymorphism of eight nuclear microsatellites for *Santalum austrocaledonicum* Accession no. in the EMBL Nucleotide Sequence Database

Locus	Accession no.	Primer sequence	Repeat motif	Length of the fragment (bp)	Annealing temperature	No. Alleles	<i>n</i>	$H_O$	$H_E$	<i>P</i> value*
mSaCIRE09	AJ831397	5'-GGAAAGGGTTGACAGGAAGAAAA-3' 5'-TGCGAGTGAGTGGGAAAAGTAGA-3'	(CT) <sub>16</sub>	176	59 °C	21	425	0.48	0.74	0.00
mSaCIRH09	AJ831402	5'-GCCTCTGCTTCCTCCCATTTGTAG-3' 5'-AACTCCATTTGTGATTCCTCCCA-3'	(GA) <sub>20</sub>	109	59 °C	14	419	0.39	0.61	0.00
mSaCIRG01	AJ831400	5'-GCTCAACCCATTTTTATCC-3' 5'-ACACAGCAGAACTCCAACA-3'	(CA) <sub>7</sub>	273	59 °C	3	409	0.23	0.29	1 * 10 <sup>-4</sup>
mSaCIRH11	AJ831404	5'-AGTCACGGAACAGCCAAGC-3' 5'-CTTCCCTGTGCCTTGTGTA-3'	(GT) <sub>8</sub> (AT) <sub>7</sub>	233	59 °C	6	429	0.40	0.53	0.00
mSaCIRG10	AJ831401	5'-GTGCTACCTGCTACCCTTTTT-3' 5'-CCAATAACGGCTTCAACTTCA-3'	(AG) <sub>18</sub> GG(AG) <sub>5</sub>	247	59 °C	33	403	0.53	0.84	0.00
mSaCIRF04	AJ831399	5'-TCATTACACAGGCATCAGAAA-3' 5'-CTACCATCCACCACCGACAT-3'	(GT) <sub>7</sub> (GA) <sub>16</sub>	229	59 °C	10	415	0.49	0.77	0.00
mSaCIRF10	AJ831398	5'-TTAGGAAAACATAGCACACT-3' 5'-GAGCACTTCACCACCATTAC-3'	(GA) <sub>17</sub>	155	59 °C	20	416	0.56	0.84	0.00
mSaCIRH10	AJ831403	5'-AAGCCCGATAACGAGAAAAGAAA-3' 5'-ATGAATAGGGATGGCGAGAGGAT-3'	(GA) <sub>27</sub>	260	59 °C	16	419	0.48	0.70	0.00

*n*, number of individuals;  $H_E$ , expected heterozygosity under HWE;  $H_O$ , observed heterozygosity. *P* values for the HWE test, significance threshold adjusted using sequential Bonferroni correction:  $P < 0.003$ .

\*0' actually refers to *P* values lower than the detection threshold (1/5000).

The amplifications were carried out with a RoboCycler Gradient 96 (Stratagene) thermalcycler under the following conditions: an initial 4-min denaturation step at 94 °C followed by 30 cycles consisting of 30 s at 92 °C, 30 s at 59 °C and 1 min at 72 °C. Then a final extension step was set at 72 °C for 5 min. Amplification products were run for 2–3 h on 4% or 6% polyacrylamide denaturing gels (depending on molecular weight) and revealed by silver staining (Creste *et al.* 2001).

Eight loci were finally useful for our study, showing specific and polymorphic amplicons: mSaCIRE09, mSaCIRH09, mSaCIRG01, mSaCIRH11, mSaCIRG10, mSaCIRF04, mSaCIRF10 and mSaCIRH10 (Table 1). The protocol was the same as the one used for the screening of the sequences.

The number of alleles found ranged from three to 33 alleles per locus and was substantially higher in Grande Terre than in the Loyauté Islands.

Microsatellite genotypes were tested for linkage disequilibria for all pairs of loci within each population using Fisher's exact test with GENEPOP (Raymond & Rousset 1995). Observed and expected heterozygotes and unbiased exact *P* value estimates were obtained by the Markov chain method computed by GENEPOP with 5000 permutations, ARLEQUIN (Schneider *et al.* 2000).

Loci were at linkage equilibrium in most of the populations, except for Hienghène, Lifou and Pindai where the linkage disequilibria could be explained by an inbred mating system. Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) were detected for all loci. In all cases, the observed frequency of heterozygotes was lower than the expected frequency (*P* values < 0.003, significance threshold adjusted with the Bonferroni procedure (Rice 1989) (Table 1)). The software MICRO-CHECKER version 2.2.3. (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to check for null alleles, which could have explained this deviation from HWE. But the eight microsatellite loci reported here showed no evidence of null alleles. However, the excess

of homozygotes has been interpreted as the result of a Wahlund effect in some populations that were structured in several subpopulations, and selfing in other populations.

### Acknowledgements

We would like to thank Alexandre Lagrange for field work in New Caledonia. Many thanks go to IAC (Institut Agronomique néo-Calédonien) and to the Development Services of the Provinces of Islands, North and South. We also acknowledge MEED (Ministère de L'Ecologie et du Développement Durable) for financial support.

### References

- Billote N, Lagoda P, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.
- Bousquet J, Simon L, Lalonde M (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissue of trees using polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Forestry Research*, **20**, 254–257.
- Creste S, Tulmann Neto A, Figueira A (2001) Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining (protocols). *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 19, Nber 4, ISSN 0735-9640, pp. 299–306.
- Nasi R, Ehrhart Y (1996) Le santal un parfum de prospérité. 1ère partie—une longue histoire. *Bois et Forêts des Tropiques*, **247**, 5–19.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 3.2a): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248–249.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis. Version 2.000. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite software. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.



## ***ANNEXE 5***

- Bottin L, Tassin J, Nasi R, Bouvet JM. Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia. *Conservation Genetics*, soumis.



# Molecular, quantitative and abiotic variables for the delineation of evolutionary significant units: case of sandalwood (*Santalum austrocaledonicum* Vieillard) in New Caledonia

Lorraine Bottin · Jacques Tassin · Robert Nasi ·  
Jean-Marc Bouvet

Received: 16 November 2005 / Accepted: 19 March 2006  
© Springer Science+Business Media, Inc. 2006

1  
2 **Abstract** Various approaches have been developed to  
3 define conservation units for plant and animal species.  
4 In this study we combined nuclear microsatellites  
5 (from a previous published study) and chloroplast mi-  
6 crosatellites (assessed in the present study), leaf and  
7 seed morphology traits and abiotic variables (climate  
8 and soil) to define evolutionary significant units (ESU)  
9 of *Santalum austrocaledonicum*, a tree species growing  
10 in New Caledonia. Results showed that the total pop-  
11 ulation heterozygosity was high,  $H_{cp} = 0.84$  for chlo-  
12 roplast microsatellites but varied between islands.  
13 Differentiation was strong in the total population  
14 ( $F_{stcp} = 0.66$ ) but also within the main island Grande  
15 Terre ( $F_{stcp} = 0.73$ ) and within Iles Loyauté  
16 ( $F_{stcp} = 0.52$ ), highlighting a limited gene flow between  
17 populations. These results confirmed those obtained  
18 with nuclear microsatellites. The cluster analysis on

molecular markers discriminated two main groups 19  
constituted by the populations of Grande Terre and the 20  
populations of Iles Loyauté. A principal component 21  
analysis of leaf and seed morphology traits singled out 22  
the populations of Iles Loyauté and the western pop- 23  
ulations of Grande Terre. Quantitative genetic analy- 24  
ses showed that the variation between populations was 25  
under genetic control (broad sense heritability close to 26  
80%). A high correlation between rainfall and mor- 27  
phological traits suggested an impact of climate on this 28  
variation. The integration of these results allows to 29  
define two ESUs, one corresponding to Grande Terre 30  
and Ile des Pins and the other the Iles Loyauté archi- 31  
pelago. This study stresses the need to restore some 32  
populations of Grande Terre that are currently threa- 33  
tened by their small size. 34

**Keywords** *Santalum austrocaledonicum* · Nuclear 35  
microsatellites · Chloroplastic microsatellites · 36  
Morphological traits · Evolutionary significant units 37

## Introduction 38

Forest ecosystems undergo negative impact due to 39  
human activities in many parts of the tropical zone. 40  
This issue is exacerbated in small tropical islands of the 41  
Pacific region, which are recognised as biodiversity hot 42  
spots (Myers et al. 2000) and rely on their forest eco- 43  
system to sustain their development. Numerous forest 44  
tree species growing in those fragile ecosystems are 45  
currently considered as seriously threatened and there 46  
is an urgent need to protect them because of their 47  
strong economic and environmental interest. The 48  
management of forest genetic resources in these 49

L. Bottin · J. Tassin · J.-M. Bouvet (✉)  
Forestry department, CIRAD, Research Unit 39 'Genetic  
diversity and breeding of forest tree species', campus de  
Baillarguet TA 10C, 34398 Montpellier Cedex 5, France  
E-mail: jean-marc.bouvet@cirad.fr  
Tel.: +33-4-67593728  
Fax: +33-467593733

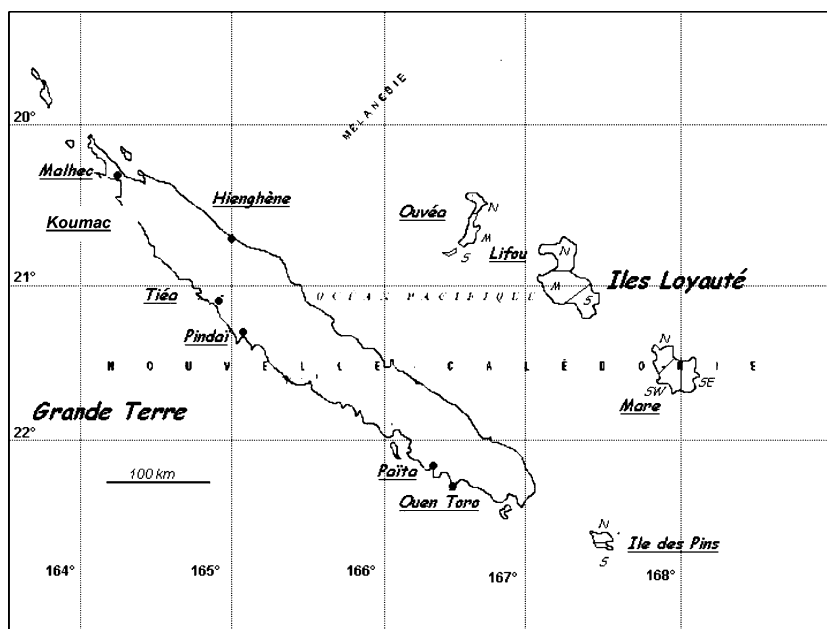
R. Nasi  
Forestry department, CIRAD, Research Unit 36 'Forest  
resources and public policies', campus de Baillarguet TA  
10D, 34398 Montpellier Cedex 5, France

J. Tassin  
Institut Agronomique Néo-Calédonien, IAC, B.P. 73, Païta,  
98890 Nouvelle-Calédonie, France

R. Nasi  
Programme on Environmental Services and Sustainable Use  
of Forests, CIFOR, 6596 JKPWB, 10065 Jakarta, Indonesia

50	regions is a critical issue, which requires an operational	and between populations in New Caledonia, in	103
51	and effective knowledge of the nature and distribution	complement to the nuclear data analysis (Bottin	104
52	of the genetic variation with respect to the ecological	et al. 2005), (ii) to analyse the differentiation between	105
53	niches of the species.	populations based on fruit and leaf morphological traits	106
54	For several years, conservation biologists have de-	and to assess its genetic determinism, and (iii) to classify	107
55	bated to define evolutionary significant units (ESU).	the sandalwood populations using molecular, quantitative	108
56	An ESU is a population that merits separate manage-	and abiotic data to define ESUs.	109
57	ment and has a high priority for conservation. The		
58	concept of ESU has evolved over time. It was first	<b>Material and methods</b>	110
59	developed by Ryder (1986), who suggested a classifi-		
60	cation based on ecological and genetic data. A more	Plant material for molecular analyses	111
61	recent ESU concept is that of Moritz (1994) which		
62	takes into consideration the increasing availability of	Individuals were collected throughout the New Cale-	112
63	molecular data, and leads to criteria based exclusively	donian archipelago: Grande Terre, Ile des Pins, and	113
64	on molecular phylogenies. Crandall et al. (2000) re-	Iles Loyauté (Ouvéa, Lifou, Maré) (Fig. 1). On	114
65	cently argued that earlier definition which included	Grande Terre, the largest island (16.890 km <sup>2</sup> ), samples	115
66	ecological and genetic variation were more appropriate	were collected from 6 populations distributed over the	116
67	for conservation.	whole area and at least 25 km apart (Ouen Toro,	117
68	Although these approaches were applied to numer-	Païta, Pindai, Tiéa, Malhec, Hienghène). Hienghène is	118
69	ous animals (Crandall et al. 2000; Moritz 2002), few	the only population known on the east coast, where	119
70	applications exist with forest tree species. Numerous	the climate is wetter and the vegetation more luxuri-	120
71	forest studies used either quantitative traits (Kle-	ant than on the west coast. Sampling can be consid-	121
72	inschmit et al. 2004) or molecular markers (Gapare	ered as exhaustive on Grande Terre, i.e, all the trees	122
73	et al. 2005; Goodall-Copestake et al. 2005). Some	of each population were selected. On each of the	123
74	studies, however, have stressed the advantage of	other islands, populations occupied a larger area and	124
75	combining molecular and adaptive traits: see, for	were more or less continuous. However, geographical	125
76	example, Bekessy et al. (2003) with the management	separation allowed us to define sub-populations within	126
77	of in situ genetic resources of <i>Araucaria araucana</i> or	each island. All the sampled populations are described	127
78	Cavers et al. (2004) defining conservation units for	in Table 1.	128
79	<i>Cedrella odorata</i> . Testing the relevance of such inte-	Leaves were collected between February 1998 and	129
80	grated approaches requires new studies under different	November 2003. Each individual, identified by its	130
81	conditions.	geographical coordinates, was only sampled once. Leaf	131
82	In the following study we use molecular markers,	specimens were placed into sealed plastic bags con-	132
83	morphological traits and abiotic variables to assess the	taining silica gel, until DNA extraction.	133
84	pattern of distribution of diversity and to define ESUs	To characterise the habitat of each population,	134
85	of <i>Santalum austrocaledonicum</i> Vieillard, a forest tree	several variables were collected using the available	135
86	species of great economic interest. This species is en-	data characterising some climate and soil conditions of	136
87	demic to the New Caledonia and Vanuatu archipela-	each population: mean annual rainfall, mean annual	137
88	gos. It is a hemiparasitic plant reaching 8 m height and	temperature, number of dry months (rainfall $\leq$ 2 mean	138
89	a trunk diameter of 30 cm, which grows in lowlands,	temperature) from the closest meteorological stations	139
90	preferentially in open areas. It occurs as isolated trees	(communicated by meteorological service in New-	140
91	or patches of various sizes. Its reproductive biology is	Caledonia) and soil characteristics from available soil	141
92	still poorly documented. The fruits whose diameter is	maps (ORSTOM 1981).	142
93	about 1 cm, are fleshy and mainly disseminated by		
94	frugivorous birds (e.g. fruit doves) and perhaps bats	Plant material for morphological analyses	143
95	within and between islands (Gibbs et al. 2001; Cox		
96	et al. 1991). <i>S. austrocaledonicum</i> produces an aro-	To analyse the differentiation based on morphological	144
97	matic wood similar to Indian sandalwood. It has been	traits we used different samples. We used a prove-	145
98	one of the most exploited sandalwood species since the	nance/progeny trial established on Grande Terre in	146
99	19th century, and is still exploited in New Caledonia.	1994. This trial was carried out from seed collection on	147
100	This paper has three main objectives: (i) to ana-	mother trees in the natural populations of Ouen Toro,	148
101	lyse the chloroplastic molecular genetic diversity of	Maré, Ouvéa and Ile des Pins. Seeds were sown and	149
102	<i>S. austrocaledonicum</i> as well as its distribution within		

**Fig. 1** Sampling sites of *Santalum austrocaledonicum* in New-Caledonia. N = North, M = Midlands, S = South, E = East, W = West



150 the seedlings were then planted under a randomised  
 151 complete block design. Before planting, at the nursery  
 152 stage, a minimum of 5 leaves was collected on 101  
 153 juvenile trees distributed in the four provenances and  
 154 measured for length and width. In 2003, 20 fruits per  
 155 tree were collected on 22 young trees distributed in the  
 156 four provenances randomly chosen in the trial. Length,  
 157 width and mass were measured. Seed size and juvenile  
 158 leaves were used to assess the adaptive variation.

In 1994, 20 seeds were collected on 5 trees in the  
 population of Koumac, which is close to the population  
 of Malhec (Table 1) in the north of Grande Terre  
 (20 km far). Seeds were measured for length and width  
 and sown. Then juvenile leaves of the seedlings were  
 measured at the nursery stage.

In 2004, 30 seeds were collected in the population of  
 Pindai (Table 1), and sown in the nursery. Once again  
 juvenile leaves were measured.

**Table 1** Description of the populations: sampling area (in Grande Terre individuals are aggregated in populations, whereas they are quite isolated in Iles Loyauté), coordinates of

the populations R: Mean annual rainfall D: number of dry months/year T: Mean annual temperature, and soil characteristics

Island [island size] (km <sup>2</sup> )	Population	Sampling area	Lat. South	Long. East	R (mm)	D	T (°C)	Soil characteristics
Grande Terre [16,350]	Ouen Toro	0.19	22°30'	166°45''	1058	3.8	23.3	Soils on schist and calcareous
	Pindai	3.43	21°31'	164°96''	894	5.4	23.1	Alluvial soil
	Malhec	0.87	20°19'	164°10''	1202	4.4	ND	Fersiallitic soils
	Païta	0.67	22°09'	166°22''	1165	ND	ND	Soils on sandstone and pelite*
	Hienghène	0.57	20°43'	164°55''	2245	2.0	24.1	Soils on sandstone, schist
	Tiéa	0.05	21°08'	164°56''	995	4.9	23.2	Vertisol
Ile des pins [152]	IP North	32.25	22°35'	167°28''	1532	2.2	22.4	Consolidated coralline sand
	IP South	25.25	22°39'	167°28''	1419	2.4	24.0	Consolidated coralline sand
Lifou [1,196]	Lifou North	275.28	20°42'	167°13''	1699	2.4	22.9	Calcareous soils
	Lifou Middle	271.81	20°58'	167°04''	1642	2.7	23.7	Calcareous soils
	Lifou South	96.95	21°01'	167°22''	2065	1.4	23.5	Calcareous soils
Mare [650]	Maré North West	125.32	21°24'	167°52''	1300	ND	23.1	Calcareous soils
	Maré South West	118.91	21°35'	167°53''	1400	2.5	22.0	Calcareous soils
	Maré East	89.18	21°33'	168°05''	1703	2.3	ND	Calcareous soils
Ouvéa [132]	Ouvéa North	45.872	20°27'	166°36'	1440	ND	ND	Calcareous soils
	Ouvéa Middle	21.399	20°38'	166°34'	1440	3.7	24.1	Calcareous soils
	Ouvéa South	20.576	20°43'	166°25'	1446	ND	ND	Calcareous soils

Mean annual rainfall, number of dry months per year, and mean annual temperature were calculated during the period 1971–2000, except for Hienghène (1992–2000), Ile des Pins South (1998–2000), Lifou South (1996–2000), Mare South-West (1986–2000)



168 In 2005, 280 seeds were collected in the population  
 169 of Païta (Table 1). Seeds were measured for length and  
 170 width and sown in the nursery.

171 Although the samples from Païta, Koumac and  
 172 Pindaï were not included in the progeny/provenance  
 173 trial, they were used in the study to have a compre-  
 174 hensive sample of the sandalwood population of  
 175 Grande Terre to analyse the trend in quantitative  
 176 variation.

177 Molecular techniques

178 Total DNA was extracted from dry leaves following  
 179 the protocol described in Bottin et al. (2005).

180 Following the sampling campaign, 218 individuals  
 181 were analysed with chloroplast microsatellites  
 182 (cpDNA). The protocol was described in a similar  
 183 study (Fontaine et al. 2004). Seven tobacco microsate-  
 184 llite primers (CCMP), six rice microsatellite primers  
 185 (RcT) and 20 tobacco microsatellites (NTCP) were  
 186 tested over a subset of the total population. Three  
 187 cpDNAs markers out of the 33 tested generated  
 188 polymorphism: CCMP3, CCMP5 and NTCP9. As the  
 189 chloroplast genome is haploid and does not undergo  
 190 recombination, it can be viewed as a single locus, so we  
 191 combined the sizes of the chloroplast microsatellites to  
 192 determine all possible chloroplast haplotypes.

193 Analyses of molecular genetic diversity and  
 194 structure of populations

195 For chloroplast microsatellites, haplotypic diversity  
 196 ( $H_{cp}$ ) and mean number of haplotypes per population  
 197 ( $A_{cp}$ ) were calculated according to the formula of Nei  
 198 (1978). Differentiation among all samples and all  
 199 sample pairs was tested using probability tests (Fisher  
 200 exact tests), as described in Raymond and Rousset  
 201 (1995). Wright's  $F_{st}$  (Wright 1951) were  
 202 estimated for the global sub-populations and all pop-  
 203 ulation pairs by a 'weighted' analysis of variance (Weir  
 204 and Cockerham 1984),  $P$ -values were calculated after  
 205 the sequential Bonferroni test (Rice 1989). To investi-  
 206 gate the genetic structure of populations, we ran an  
 207 analysis of molecular variance with 1000 permutations  
 208 (AMOVA, Excoffier et al. 1992), which tests a partic-  
 209 ular genetic structure by partitioning the total variance  
 210 into covariance components due to inter-individuals  
 211 differences and inter-populations differences.

212 All the genetic parameters, those related to diversity  
 213 and those related to AMOVA and  $F_{st}$  and the appropri-  
 214 ate tests were computed using ARLEQUIN soft-  
 215 ware (Schneider et al. 2000)

216 Following Ennos (1994) we estimated the pollen/seed  
 217 flow ratio ( $R_{p/s}$ ) by the formula:  $R_{p/s} = [A(1 + F_{is}) - 2C]/$   
 218  $C$ , where  $A = (1/F_{stnuc} - 1)$  and  $C = (1/F_{stcp} - 1)$ . The fix-  
 219 ation index ( $F_{is}$ ) and the Wright's  $F$ -statistics for nuclear  
 220 data  $F_{stnuc}$  where estimated in Bottin et al. (2005) and were  
 221 used to calculate the  $R_{p/s}$  ratio.

222 A cluster analysis was conducted on the molecular  
 223 data obtained by nuclear and chloroplast microsate-  
 224 lites. The variables were the allelic frequencies of nu-  
 225 clear and chloroplastic loci representing respectively: 8  
 226 loci and 124 alleles (Bottin et al. 2005) and one locus  
 227 and 15 alleles. Pairwise genetic distances between pairs  
 228 of populations were computed using the Euclidian  
 229 distance. The distance tree was constructed using the  
 230 neighbour-joining method of Saitou and Nei (1987).  
 231 The robustness of each node was assessed by boot-  
 232 strapping data over loci and alleles with 1000 replica-  
 233 tions. A consensus tree using the method of strict  
 234 consensus was elaborated with the two previous trees.  
 235 All calculations and representations were processed  
 236 using Darwin 3.6 software (Perrier et al. 2003).

Morphological trait analyses 237

238 Trait means were calculated on each island using the  
 239 MEANS procedure of SAS software (SAS Institute  
 240 1990).

241 Using the data collected from the 1994 experimental  
 242 trial and during the following samplings in 2003, 2004  
 243 and 2005, a principal component analysis was applied  
 244 to quantitative traits: juvenile leaf length and width  
 245 and seed length were used to characterise the popula-  
 246 tions. Supplementary variables such as soil character-  
 247 istics, mean annual rainfall and number of dry months  
 248 (see Table 1) were added to illustrate the relationship  
 249 between population characteristics defined by biologi-  
 250 cal traits and abiotic conditions. The analyses were  
 251 conducted with the XLSTAT software (Addinsoft  
 252 2005).

253 With data collected in the progeny/provenance trial,  
 254 variance components (variation between islands, be-  
 255 tween populations within islands, and an error varia-  
 256 tion) were estimated with the VARCOMP procedure  
 257 and the REML method (SAS Institute 1990) using  
 258 random models. Trait heritability was assessed using  
 259 the classical formula approach (Falconer and McKay  
 260 1996) and calculated on the basis of population mean  
 261 (broad sense heritability estimated by the ratio of the  
 262 variance between populations over the total variance:  
 263 sum of the between plus the within population vari-  
 264 ances).

265 **Results**

266 Molecular genetic diversity

267 The results of diversity based on nuclear microsatel- 287  
 268 lites are given in Bottin et al. (2005). 288

269 All 3 chloroplast microsatellite loci were variable, 291  
 270 giving 11 alleles: 3 for locus CCMP3, 4 for CCMP5 and 292  
 271 4 for NTCP9. The combination of the 3 loci gave 15 293  
 272 different haplotypes. Most of the populations showed 3 294  
 273 haplotypes (Table 2), with extremes in Hienghène, 295  
 274 Maré SW, Maré SE and Ouvéa S ( $A_{cp} = 1$ ) and Lifou 296  
 275 N ( $A_{cp} = 4$ ). In the total population, three chlorotypes 297  
 276 exhibited frequencies around 20%; the remaining 12 298  
 277 presenting low frequencies. Haplotype diversity of the 299  
 278 total population was  $H_{cp} = 0.83$  and ranged from 300  
 279  $H_{cp} = 0.00$  in Hienghène, Maré SW, Maré SE and 301  
 280 Ouvéa S to  $H_{cp} = 0.69$  in Lifou N (Table 2). The ha- 302  
 281 plotypic diversity was not related to the area sampled 303  
 282 but to the number of individuals sampled in each is- 304  
 283 land, except on Maré which had the lowest diversity 305  
 284 ( $H_{cp} = 0.21$ ) despite its large number of sampled indi- 306  
 285 viduals ( $N_{cp} = 35$ ). 307

**Table 2** Genetic diversity parameters for the population of *S. austrocaledonicum* based on chloroplast microsatellite

Population	Chloroplast microsatellite parameters		
	$N_{cp}$	$A_{cp}$	$H_{cp}$
Ouentoro	21	2	0.10(0.08)
Pindai	16	3	0.24(0.14)
Malhec	9	2	0.39(0.16)
Paita	11	3	0.65(0.11)
Hienghène	11	1	0.00(0.00)
Tiéa	9	3	0.56(0.17)
GrandeTerre	77	8	0.70(0.04)
Ile des Pins N	14	3	0.60(0.08)
Ile des Pins S	18	3	0.46(0.13)
Ile des Pins	32	23	0.57(0.07)
Lifou N	20	3	0.73(0.06)
Lifou M	26	4	0.73(0.04)
Lifou S	10	3	0.38(0.18)
Lifou	56	8	0.70(0.04)
Maré N	15	3	0.45(0.13)
Maré SW	10	1	0.00(0.00)
Maré SE	10	1	0.00(0.00)
Maré	35	3	0.21(0.09)
Ouvéa N	11	2	0.18(0.14)
Ouvéa M	5	2	0.60(0.18)
Ouvéa S	2	1	0.00(0.00)
Ouvéa	18	3	0.45(0.12)
Iles Loyauté	109	9	0.72(0.02)
Total	218	15	0.83(0.01)

$N_{cp}$ : number of individuals,  $A_{cp}$ : number of alleles per locus,  $H_{cp}$ : heterozygosity (standard error in brackets)

Molecular genetic differentiation 286

287 The results of differentiation based on nuclear micro- 288  
 289 satellites are given in Bottin et al. (2005), only the 290  
 291 cluster analysis using a new distance method was pre- 292  
 293 sented here. 294

295 Using chloroplast microsatellites, global  $F_{st}$  value 296  
 297 was very high and significantly different from zero 298  
 299 ( $F_{stcp} = 0.66$ ,  $P < 0.0001$ ). The  $F_{stcp}$  value was also very 300  
 301 high between the populations of Grande Terre 302  
 303 ( $F_{stcp} = 0.73$ ,  $P < 0.0001$ ) and between the populations 304  
 305 of Iles Loyauté ( $F_{stcp} = 0.52$ ,  $P < 0.0001$ ). Among the 306  
 307 127 pairwise  $F_{stcp}$  values, 20 did not significantly differ 308  
 309 from zero at the  $P = 0.0004$  level (Table 3). 310

311 The differentiation between populations was high- 312  
 313 lighted by the cluster analysis using separately nuclear 314  
 315 and chloroplast microsatellite data (Fig. 2a, b) and by a 316  
 317 combination of those two trees using a consensus tree 318  
 319 approach (Fig. 2c). 320

321 Using nuclear microsatellites, the populations of Iles 322  
 323 Loyauté were clearly separated from the populations 324  
 325 of the West coast of Grande Terre and Ile des Pins. 326  
 327 Lifou, Maré and Ouvéa exhibited three clusters, but 328  
 329 the first two were moderately separated (bootstrap 330  
 331 value of 55%). Hienghène and Malhec were isolated 332  
 333 whereas Tiea and Pindai, and Paita and Ouen Toro 334  
 335 constituted two clusters (bootstrap values 61 and 88, 336  
 337 respectively). 338

339 Using chloroplast microsatellites, the distinction 340  
 341 between Grande Terre and Iles Loyauté was also 342  
 343 marked. Within Iles Loyauté the bootstrap values were 344  
 345 smaller than 50 and do not separate the three islands 346  
 347 (33 and 43). Pindai and Hienghène were isolated and 348  
 349 populations of Ile des Pins did not show a separation 350  
 351 from the other populations of Grande-Terre. 352

353 The consensus tree clearly showed two groups, 354  
 355 Grande-Terre/Ile des Pins versus Iles Loyauté 356  
 357 (Fig. 2c). Some smaller clusters were observed, e.g. 358  
 359 Ouen Toro and Paita or Lifou and Ouvéa populations. 360  
 361 The other populations appeared under a star pattern 362  
 363 suggesting a low congruence between the two clusters. 364

Morphological trait analyses 326

327 Principal component analysis integrating the data 328  
 329 measured in the progeny/provenance trial and the data 330  
 331 measured in natural stands showed that 98% of the 332  
 333 variation was explained by the first two factors (Fig. 3). 334  
 335 The first factor (79% of the total variation) was 336  
 337 explained by seed and leaf sizes and contrasted popu- 338  
 339 lations with high leaf length to populations with high 339  
 340 seed and leaf width (Fig. 3a). The plane defined by the 340  
 341 first two axes separated the populations of Iles Loyauté 341  
 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365

**Table 3** Results of the analysis of molecular variance testing the variance components according to different distributions of the population for chloroplast microsatellites. \*\*\*: significant at  $P = 0.0001$

Range	Source of variation	d.f.	Percentage of variation	$F_{stcp}$
Total range	Among islands	4	37.17	0.6***
	Among populations within islands	12	28.54	
	Within populations	201	34.29	
	Total	217		
Iles Loyauté	Among islands	2	37.87	0.52***
	Among populations within islands	6	14.64	
	Within populations	100	47.49	
	Total	108		
Grande Terre	Among populations	5	73.04	0.73***
	Within populations	71	26.96	
	Total	76		

df: degree of freedom

Percentage of variation: ratio of variance of effect over total variance

$F_{stcp}$ : measure of differentiation among populations

336 (Ouvéa, Maré) from the populations of Grande Terre  
 337 (Ouen Toro, Païta, Pindaï, Koumac), the population of  
 338 Ile des Pins occupying an intermediate position but  
 339 closer to the Grande Terre population (Fig. 3b). The  
 340 populations of Grande Terre were characterised by  
 341 thinner and longer juvenile leaves and smaller seeds  
 342 than those of the Iles Loyauté. The mean annual  
 343 rainfall and the number of dry months and the soil  
 344 characteristics were added as supplementary variables.  
 345 Rainfall was positively and significantly correlated with  
 346 leaf width ( $R = 0.77, P < 0.05$ ), and moderately corre-  
 347 lated with seed length ( $R = 0.66, P < 0.10$ ) and seed  
 348 width ( $R = 0.75, P < 0.10$ ). The number of dry months  
 349 was not correlated with the first two traits, respectively  
 350 ( $R = -0.55, NS$ ), ( $R = -0.495, NS$ ) and moderately  
 351 negatively correlated with the latter ( $R = -0.628,$   
 352  $P < 0.10$ ). This analysis showed a marked concordance  
 353 between size of seed and juvenile leaves and climatic  
 354 conditions of New Caledonia.

355 The between ( $\sigma_p^2$ ) and within ( $\sigma_{wp}^2$ ) population  
 356 genetic variances (Table 4) were significantly different  
 357 from zero at the 0.1% level for each trait. The be-  
 358 tween-population component was higher than within-  
 359 population component, and represented about  
 360  $H^2 = 80\%$  of the total variation, except for the seed  
 361 length/width ratio (Table 4).

## 362 Discussion

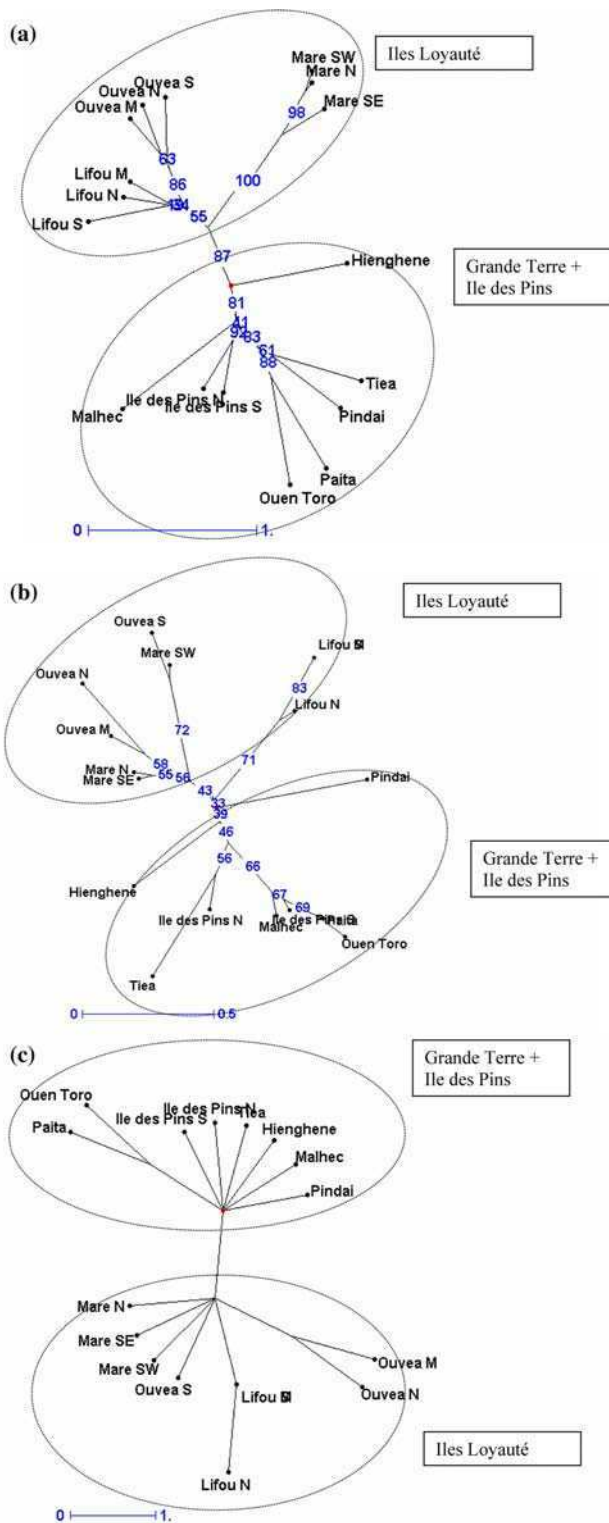
### 363 Genetic diversity and threat to populations

364 To conserve and manage diversity of natural stands  
 365 and/or to put in place genetically sound plantations,  
 366 one preliminary approach consists in studying genetic

diversity and its distribution within and between the 367  
 populations (Newton et al. 1999). 368

In this study we used molecular markers to assess 369  
 within-population diversity. Although this approach 370  
 only gives an incomplete view of the genetic diversity 371  
 related to adaptive traits (Reed and Frankham 2003), it 372  
 allowed the comparison with other species. The total 373  
 expected heterozygosity was  $H_{cp} = 0.83$  for chloroplast 374  
 microsatellites. This value is very similar to those ob- 375  
 served in forest tree species growing in continental 376  
 areas (Butaud et al. 2005) and suggests that *S. austro-* 377  
*caledonicum* has evolved for a long period in condi- 378  
 tions favourable for the expression of its diversity. 379  
 However, the diversity parameters  $H_{cp}$  and  $A_{cp}$  varied 380  
 among islands and were low in two of the three Iles 381  
 Loyauté. This result was also observed with nuclear 382  
 microsatellites (Bottin et al. 2005) and is in accordance 383  
 with other studies showing a lower molecular diversity 384  
 in small islands compared to mainland (Frankham 385  
 1997; Barrett 1998). Moreover, the fixation index  $F_{is}$  386  
 obtained with nuclear microsatellites was positive and 387  
 significantly different from zero for the three Loyauté 388  
 islands (Bottin et al. 2005). These authors proposed 389  
 different reasons to explain this result which was ob- 390  
 served in other island population studies (Frankham 391  
 1998): although the presence of null alleles and the 392  
 whalund effect cannot be totally rejected, the 393  
 assumption of an increased selfing in some population 394  
 appeared to be the main explanatory factor. Actually, 395  
 as suggested by Barrett (1998) an evolution of the 396  
 mating system towards self-pollination could result 397  
 from a lack of pollinator in some islands. 398

Although the populations of Grande Terre exhibit 399  
 high values in diversity parameters, they are more 400  
 threatened than their Iles Loyauté counterparts 401



**Fig. 2** Neighbour-joining tree based on nuclear and chloroplast microsatellite markers illustrating the relationships between the populations. Bootstrap values calculated after 1000 permutations are presented at the base of each cluster. **(a)** nuclear microsatellites, **(b)** chloroplast microsatellites, **(c)** consensus tree

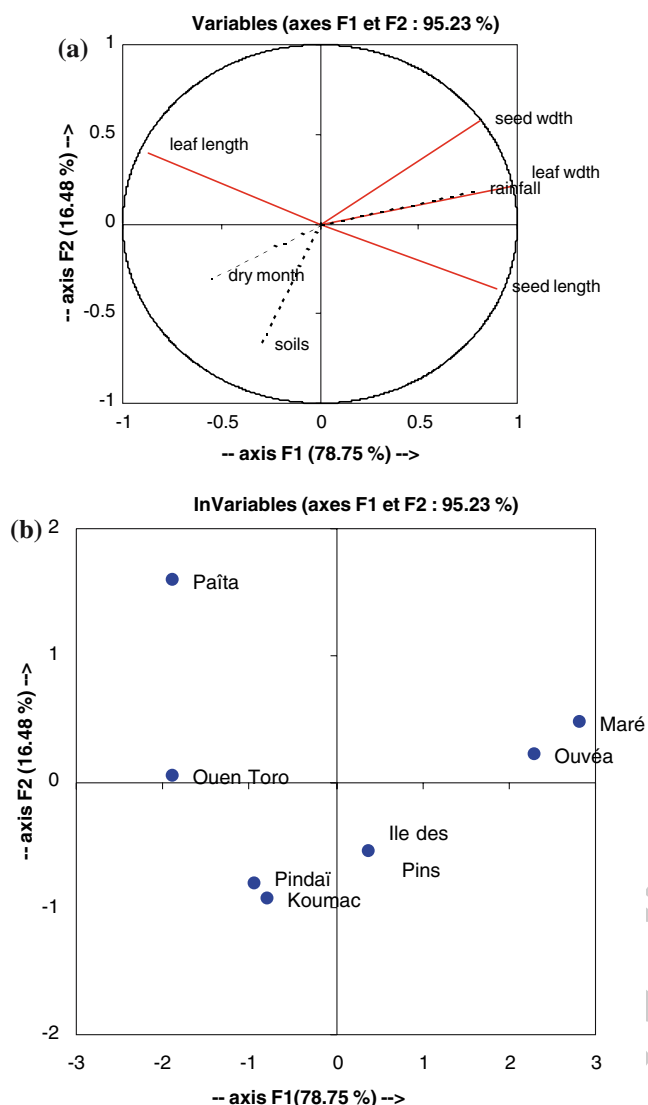
because their population sizes are very small: except for Ouen Toro, the sampling size ( $N_{cp}$  in Table 2) is very close to the total number of adult trees present in the population. The high values of heterozygosity parameters and the fixation index close to zero observed with nuclear microsatellites (Bottin et al. 2005) may represent the diversity of the former unfragmented population. The reduction in size, due to overexploitation, is actually a recent event compared to the longevity of the tree (one century for adult trees) and the genetic drift has not yet had a strong effect due to the small number of generation after population decrease. In those populations, in a period of a few generations, the risks related to demographic and environmental stochasticity are higher than those due to genetic factors such as inbreeding depression, and the immediate restoration of the size of population as a management action is required.

#### Differentiation based on molecular markers

Island species are expected to be more differentiated than continental ones, at least at neutral loci, because of the restricted gene flow due to oceanic barriers and, at the within-island level, of the possible dominance of the founding event, of the isolation from source population, and of the stochastic processes due to their limited size (Barrett 1998). Our results confirm these general principles because  $F_{STCP}$  value is high compared to that of others species although the natural range of *S. austrocaledonicum* concerns a limited area (Butaud et al. 2005).

Within Grande-Terre, the differentiation parameter is also high ( $F_{STCP} = 0.73$ ), compared to values observed in continental species with a continuous range (Butaud et al. 2005). This is likely to result from a limited gene flow between populations and from a drift effect favoured by the fragmentation of the dry forest along the west coast. Fragmentation did not, however, affect the genetic diversity of these populations and inbreeding was limited (Bottin et al. 2005), as the likely result of a recent reduction of the effective population size. Bottin et al. (2005) also showed that the populations of these species were differentiated by a process of isolation by distance within Grande Terre and within Iles Loyauté.

The combination of the data of chloroplast and nuclear microsatellites (Bottin et al. 2005) enables the comparison of seed and pollen flow in a species distributed in both continental zones and small islands. Within Grande Terre island we found  $R_{p/s} = 8$  and within Iles Loyauté  $R_{p/s} = 1$ . The ratios were strongly smaller than those of tree species distributed in a continental range which are wind-pollinated, for



**Fig. 3** Principal component analysis of morphological (leaf and seed size) and climatic variable based on 7 sandalwood populations. **(a)** axis 1 explains 78.75% of the variation and is determined by seed and leaf size, axis 2 explains 16.48% of the variation and is determined by the same variables. Position of supplementary variables (soil, dry month and rainfall) are illustrated by dotted lines. **(b)** Plot of the 7 populations in the plane explained by the first two axes F1 and F2

453 example *Quercus robur* ( $R_{p/s} = 286$ ), *Quercus petraea*  
 454 ( $R_{p/s} = 500$ ) (King and Ferris 1998) and smaller than  
 455 those of species whose pollen is disseminated by in-  
 456 sects and seeds by gravity or animals and distributed  
 457 of continental range; for example *Vitellaria paradoxa*  
 458 ( $R_{p/s} = 47$ ) (Fontaine et al. 2004) and for *Dalbergia*  
 459 *monticola* ( $R_{p/s} = 15$ ) (Andrianoelina et al. in press).  
 460 These  $R_{p/s}$  values stressed the difference between the  
 461 islands and continental part of the natural range of the  
 462 species

464 The analysis of morphological traits related to adap-  
 465 tation is of critical interest because it provides reliable  
 466 information on the ability of a population to be con-  
 467 served under present conditions (Bekessy et al. 2003).  
 468 We showed a clear quantitative variation between is-  
 469 lands (Table 4). As these measurements were made in  
 470 a single experimental trial with replications of popu-  
 471 lations, genetic and environmental effects can be sep-  
 472 arated, and the importance of genetic variation can be  
 473 estimated. With a broad sense heritability calculated  
 474 on the basis of population mean, our results demon-  
 475 strated that there is an inherited source of variation  
 476 that led to phenotypic differences between islands for  
 477 both juvenile leaf and seed characters. The values of  
 478 broad sense heritability were particularly high com-  
 479 pared to other studies analysing leaf and fruit traits  
 480 (e.g., in Sanou et al. 2006) what can be explained by  
 481 the combined effects of adaptation and differentiation  
 482 due to limited gene flow. Our results showed that  
 483 heritability of leaf length/width ratio was about two-  
 484 fold that of seed length/width ratio, hence the former  
 485 character has much greater genetic determination.  
 486 This difference can be explained by a lower genetic  
 487 variance of this allometric ratio for seeds, as demon-  
 488 strated by the coefficient of variation (Table 4). This  
 489 could result from the effect of a stabilising selection,  
 490 but new investigations are needed to confirm this  
 491 assumption, numerous factors influencing the size of  
 492 seeds in wild population (Silvertown 1989; Pizo et al.  
 493 2006).

494 Additionally, a good correlation with mean annual  
 495 rainfall was observed with these traits. This correlation  
 496 can result from the impact of natural selection, which  
 497 favours bigger seeds in wetter areas and thinner juve-  
 498 nile leaves in dryer areas. This assumption is suggested  
 499 by a previous study, which reported similar patterns in  
 500 seed variation in Hawaii (Carlquist 1980). The author  
 501 observed that seeds of *Pittosporum* spp. or *Pritchardia*  
 502 ssp. were bigger in humid zones than in dry zones, and  
 503 explained this by an evolutionary adaptation to the  
 504 accumulation of more reserves in shadowed environ-  
 505 ments where competition is high (more vegetation is  
 506 due to higher mean annual rainfall). Hence, the bigger  
 507 size of seeds in the Iles Loyauté, where rainfall is  
 508 higher than in the west coast of Grande Terre, could be  
 509 an advantage when growing in an environment that is  
 510 competitive due to higher rainfall. New samples are  
 511 required to confirm this hypothesis; collection of fruits  
 512 from the Hienghène population, where mean annual  
 513 rainfall is similar to that in Iles Loyauté, could provide  
 514 new insight.

**Table 4** Juvenile leaf and seed characteristics and estimates of variance components

Parameter	Juvenile leaves				Seed			
	N ind	Length (mm)	Width (mm)	Ratio	N ind	Length (mm)	Width (mm)	Ratio
Mean	105	51.5	6.1	13.3	430	8.7	7.1	1.24
Max		71.8	11	27.1		9.4	8.8	1.32
Min		42.3	3	3.9		7.5	5.7	1.14
CV (%)		29	57	80		11	14	10
$\sigma_p^2$		234.118	16.597	142.741		0.0099	0.0155	0.0069
$\sigma_{wp}^2$		101.576	2.975	28.012		0.0045	0.0028	0.0094
$H^2 = \sigma_p^2 / (\sigma_p^2 + \sigma_{wp}^2)$		0.70	0.85	0.83		0.71	0.85	0.42

Means are obtained from the provenance trial planted in 1994 at Païta and from data obtained from collection in natural populations. Variance components are estimated with populations established in the provenance progeny trial.  $\sigma_p^2$ : variance between populations,  $\sigma_{wp}^2$ : variance within populations,  $H^2$ : broad sense heritability based on the population mean

Ratio: calculated as the length over width of juvenile leaf or seed

515 Juvenile leaf variation between islands also ap- 516  
 517 peared to be under genetic control. For juvenile leaf 518  
 519 size, the correlation with mean annual rainfall was also 520  
 521 high. Several authors report a decrease in leaf size 522  
 523 when rainfall is low (Sanou et al. 2006). Actually, 524  
 525 reduction of leaf area limits evaporation in a dry 526  
 527 environment (McDonald et al. 2003). 528

529 Although some missing data prevent us from 530  
 531 obtaining a complete pattern of the quantitative varia- 532  
 533 tion among all the populations of New-Caledonia, we 534  
 535 can assume that the variation in leaf and seed mor- 536  
 537 phology results from an adaptation to varying rainfall 538  
 539 conditions. Two main groups can then be defined based 540  
 541 on the separation along the axis 1 of the principal com- 542  
 543 ponent analysis, which represents the most part of the 544  
 545 variation (78.75%) (Fig. 3a, b); the west coast of Grande 546  
 547 Terre associated with Ile des Pins and Iles Loyauté. 548

532 Defining ESUs

533 Our results using molecular markers, morphological 534  
 535 traits and abiotic variables lead to the definition of two 536  
 537 main zones within the natural distribution: the west 538  
 539 coast of Grande Terre, which corresponds to the range 540  
 541 of dry forest, and the Iles Loyauté archipelago. Actu- 542  
 543 ally, these two regions are differentiated by the com- 544  
 545 bined effect of marked genetic drift due to historical 546  
 547 (chloroplast markers) and more recent (nuclear 548  
 549 markers) limited gene flow and the effect of natural 550  
 551 selection resulting from contrasted environmental 552  
 553 conditions. Moreover a significant homogeneity is ob- 554  
 555 served within these two regions. Within the Iles Loy- 556  
 557 auté region, although the cluster analysis shows that 558  
 559 Maré is significantly separated from Lifou and Ouvéa 560  
 561 (Fig. 2) the differentiation based on quantitative traits 562  
 563 is not marked (Fig. 3a). 564

549 On Grande Terre, populations are differentiated by 550  
 551 molecular markers, but moderately by leaf and seed

551 morphology; Fig. 3b shows a difference between the 552  
 553 populations from the southern and northern parts, but 554  
 555 only on the axis 2, which represents only 16.48% on the 556  
 557 total variation. Ile des Pins is included in the cluster of 558  
 559 Grande Terre based on molecular markers (Fig. 2a–c) 560  
 561 and is weakly differentiated from Grande Terre pop- 562  
 563 ulations on the basis of quantitative traits (Fig. 3). 564

555 The population of Hienghène remains isolated and 556  
 557 cannot be linked to the different groups based on 558  
 559 molecular markers because it appears intermediate 560  
 561 between Grande Terre and Iles Loyauté (Fig. 2a). At 562  
 563 this stage no information is available on quantitative 564  
 565 traits for this relict population. Past information sug- 566  
 567 gests that populations of sandalwood were present on 568  
 569 the east coast of Grande Terre and have been strongly 570  
 571 exploited (Shineberg 1967). New inventories should be 572  
 573 conducted along the east coast to improve the sam- 574  
 575 pling. Hienghène should, however, at this stage, be 576  
 577 considered as a specific population. 578

579 These observations suggest defining two ESUs in the 580  
 581 sense of Ryder (1986): one including the Ile des Pins 582  
 583 and the west coast of Grande Terre, and the other 584  
 585 composed of the three Iles Loyauté. The definition of 586  
 587 these two ESUs is congruent with the Crandall ap- 588  
 589 proach (Crandall et al. 2000), which defines categories 590  
 591 of population distinctiveness based on rejection or 592  
 593 failure to reject the null hypotheses ( $H_0$ ) of genetic and 594  
 595 ecological exchangeability for both recent and histori- 596  
 597 cal time frames (see Fig. 1 in Crandall et al. 2000). 598

580 Defining a conservation strategy

581 Based on the two ESUs previously defined, our main 582  
 583 recommendations consist in maintaining the evolu- 584  
 585 tionary processes within each unit but with a different 586  
 587 strategy according to population size. 588

585 The populations of Iles Loyauté and Ile des Pins are 586  
 587 large and undergo abundant natural regeneration 588



587 thereby guaranteeing the survival of the population.  
588 The inventories carried out on these islands in 2003  
589 and 2004 showed a structure of tree size classes  
590 favourable to the reconstitution of the population. The  
591 legal measures taken by the forest service for the  
592 exploitation of *S. austrocaledonicum* should, however,  
593 be maintained and strictly enforced to ensure a sus-  
594 tainable use of the species.

595 At the same time, some populations of Grande  
596 Terre are threatened by their very small population  
597 size (Hienghène, Malhec, Pindaï, Tiea, Païta) and a  
598 quasi absence of natural regeneration, mainly because  
599 sandalwood seedlings are consumed by feral deer. In  
600 order to maintain local adaptations that contribute to  
601 the adaptive diversity of the species and to prevent  
602 'outbreeding' depression due to the diverging adaptive  
603 differences (McKay and Latta 2002), we recommend  
604 facilitating natural regeneration and/or restoring the  
605 population by replanting areas using the same prove-  
606 nance. Using local or alien provenances has been de-  
607 bated. Wilkinson (2001) suggested that the use of alien  
608 provenances can be done in some cases. However,  
609 other authors suggest that the use of local genes to  
610 restore populations should be a standard practise  
611 (Sackville Hamilton 2001). The high gene diversity  
612 assessed with molecular markers and the low level of  
613 inbreeding in these populations (Bottin et al. 2005)  
614 suggest a recent critical situation. Increasing the size of  
615 the population by appropriate plantation of local  
616 provenances and by facilitating natural regeneration  
617 around the residual trees should prevent rapid extinc-  
618 tion. The conservation of sandalwood should also be  
619 integrated into the framework of the restoration of the  
620 sclerophyll forest of the west coast, which is considered  
621 as one of the most threatened ecosystems of New  
622 Caledonia (Gillespie and Jaffré 2003).

623 **Acknowledgements** These results are part of Lorraine Bottin's  
624 PhD thesis on the analysis of genetic diversity of *Santalum*  
625 *austrocaledonicum*. This study was supported by the sandalwood  
626 project funded by the MEDD, the French Ministry of Ecology  
627 and Sustainable Development. The laboratory work and analyses  
628 were done in the Forest Department of Cirad in Montpellier,  
629 France, where J.M. Bouvet is the head of the "Forest Genetics"  
630 research unit. We would like to thank Alexandre Vaillant for  
631 laboratory work, and Alexandre Lagrange and Géraldine Der-  
632 roire for field work in New Caledonia. Many thanks go to IAC  
633 (Institut Agronomique néo-Calédonien) and to the Develop-  
634 ment Services of the Provinces of Islands, North and South which  
635 facilitated the field operation.

## 636 References

637 Addinsoft (2005) XLSTAT software version 7.5.2 [http://](http://www.xlstat.com)  
638 [www.xlstat.com](http://www.xlstat.com)

- Andrianoelina O, Rakotondraoelina H, Ramamonjisoa L et al. (2005) Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae), an endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. *Biodivers Conserv*, in press
- Barrett SCH (1998) The reproductive biology and genetics of island plants. In: Grant PR (ed) *Evolution on islands*. Oxford University Press, Oxford UK, pp 18–34
- Bekessy SA, Ennos RA, Burgmana MA, Newton AC, Ades PK (2003) Neutral DNA markers fail to detect genetic divergence in an ecologically important trait. *Biol Conserv* 110:267–275
- Bottin L, Verhaegen D, Tassin J, Olivieri I, Vaillant A, Bouvet JM (2005) Genetic diversity and population structure of an insular tree, *Santalum austrocaledonicum* in New Caledonian archipelago. *Mol Ecol* 14(7):1979–1989
- Butaud J-F, Rives F, Verhaegen D, JM Bouvet (2005) Distribution of chloroplastic microsatellite diversity in *Santalum insulare* across the South east Pacific archipelagos. *J Biog* 32:1763–1774
- Carlquist S (1980) *Hawai'i: a natural history. geology, climate, native flora and fauna above the shoreline*, 2nd edn. Pacific Tropical Botanical Garden, Lawa'i Hawa'i
- Cavers S, Navarro C, Lowe AJ (2004) Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case study of *Cedrela odorata* L. *For Ecol Mgmt* 197:285–294
- Cox PA, Elmquist T, Pierson ED, Rainey WE (1991) Flying foxes as strong interactors in South Pacific islands ecosystems: a conservation hypothesis. *Conserv Biol* 5:448–454
- Crandall KA, Bininda-Emonds ORP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol Evol* 15:290–295
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72:250–259
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491
- Falconer DS, McKay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*. Longman Sci and Tech, Harlow United Kingdom
- Fontaine C, Lovett PN, Sanou H, Maley J, Bouvet JM (2004) Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity* 93:639–648
- Frankham R (1997) Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78:311–327
- Frankham R (1998) Inbreeding and extinction: island populations. *Conserv Biol* 78:665–675
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol Ecol* 10:2741–2752
- Gapare WJ, Aitken SN, Ritland CE (2005) Genetic diversity of core and peripheral Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr) populations: implications for conservation of widespread species. *Biol Conserv* 123:113–123
- Gibbs D, Barnes E, Cox J (2001) *Pigeons and doves. A guide to the pigeons and doves of the world*. Pica press, Sussex
- Gillespie TW, Jaffré T (2003) *Tropical dry forests in New Caledonia*. *Biodiv Conserv* 12:1687–1697
- Goodall-Copestake WP, Hollingsworth ML, Hollingsworth PM, Jenkins GI, Collin E (2005) Molecular markers and ex situ conservation of the European elms (*Ulmus* spp.). *Biol Conserv* 122:537–546
- Hallé N (1988) *Santalaceae*. In: *Flore de Nouvelle-Calédonie et Dépendances*, tome 15. Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Phanérogamie, Paris, France

705 King RA, Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of  
706 *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Mol Ecol* 7:1151–1161

707 Kleinschmit JRG, Kownatzki D, Gregorius HR (2004) Adapta-  
708 tional characteristics of autochthonous populations—con-  
709 sequences for provenance delineation. *For Ecol Mgmt*  
710 197:213–224

711 Mc Donald PG, Fonseca CR, Overton J McC, Westoby M (2003)  
712 Leaf size divergence along rainfall and soil-nutrient gradi-  
713 ents: is the method of size reduction common among  
714 clades?. *Funct Ecol* 17:50–57

715 McKay JK, Latta RG (2002) Adaptive population divergence:  
716 markers, QTL and traits. *Trends Ecol Evol* 17:285–291

717 Moritz C (1994) Defining ‘evolutionary significant unit’ for  
718 conservation. *Trends Ecol Evol* 9:373–375

719 Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the  
720 evolutionary processes that sustain it. *Syst Biol* 51:238–254

721 Myers N, Mittermeyer RA, Mittermeyer CG, da Fonseca GAB,  
722 Kent G (2000) Biodiversity hotspots for conservation pri-  
723 orities. *Nature* 403:853–858

724 Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic  
725 distance from a small number of individuals. *Genetics*  
726 89:583–590

727 Newton AC, Allnut TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA  
728 (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation  
729 and the conservation of tree species. *Trends Ecol Evol*  
730 14:140–145

731 ORSTOM (1981), Atlas de Nouvelle Calédonie et Dépendances  
732 Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003). Data analysis methods. In:  
733 Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (eds) *Genetic*  
734 *diversity of cultivated tropical plants*. Enfield Science  
735 Publishers, Montpellier, pp 43–76

736 Pizo MA, Von Allmen C, Morellato LPC (2006) Seed size vari-  
737 ation in the palm *Euterpe edulis* and of seed predators on  
738 germination and seedling survival. *Acta Oecologia* (in press)  
739 doi:10.1016/j.actao.2005.11.011

740 Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 3.2a):  
741 population genetics software for exact tests and ecumenism.  
742 *J Heredity* 86:248–249

743 Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and  
744 genetic diversity. *Conserv Biol* 17:230–237

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*  
43:223–225

Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: the di-  
lemma of subspecies. *Trends Ecol Evol* 1:9–10

Sackville Hamilton NR (2001) Is local provenance important in  
habitat creation? A reply. *J Appl Ecol* 38:1374–1376

Sanou H, Lovett PN, Bouvet JM (2005) Comparison of quanti-  
tative and molecular variation in agroforestry populations of  
the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F Gaertn) in Mali. *Mol*  
*Ecol* 14:2601–2610

Sanou H, Picard N, Lovett PN, Dembélé M, Korbo A, Diarisso  
D, Bouvet JM (2006) Phenotypic variation of agromorpho-  
logical traits of the shea tree, *Vitellaria paradoxa* C.F Gaertn,  
in Mali. *Genet. Resour Crop Evol* 53:145–161 DOI  
10.1007/s10722-004-1809-9

Saitou N, Nei M (1987) The neighbour-joining method: a new  
method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*  
4:406–425

SAS Institute Inc (1990) SAS/STAT user’s guide, release 6.03  
edn. SAS Institute Inc., Gary N.C

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software  
for population genetics data analysis. User manual ver 2.0.  
Genetics and Biometry Lab, Dept. Anthropology, Univer-  
sity of Geneva. 11 pages. Free program distributed by the  
authors over internet from lgb.unige.ch/arlequin/

Shineberg D (1967) They came for sandalwood. Melbourne  
University Press

Silvertown J (1989). The paradox of seed size and adaptation.  
*Trends Ecol Evol* 4:24–26

Slatkin M, Barton NH (1989) A comparison of three indirect  
methods for estimating average levels of gene flow. *Evolu-  
tion* 43:1349–1368

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the  
analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370

Wilkinson DM (2001) Is local provenance important in habitat  
creation? *J Appl Ecol* 38:1371–1373

Wright S (1951) The genetical studies of population. *Ann Eugen*  
15:328–354

UNCORRECTED







## Résumé

Les îles océaniques constituent de véritables « laboratoires naturels » pour comprendre l'impact des forces évolutives sur la biodiversité. Les effets de dérive génétique et l'impact de la sélection naturelle apparaissent d'autant plus exacerbés que les îles sont isolées et soumises à de forts gradients environnementaux. Notre étude associe des marqueurs moléculaires neutres et des caractères liés à l'adaptation afin d'évaluer l'influence de ces différentes forces dans le contexte insulaire de Nouvelle-Calédonie sur l'espèce forestière *Santalum austrocaledonicum*. L'étude des microsattellites nucléaires et chloroplastiques montre une différenciation nette des populations des petites îles Loyauté et un isolement par la distance au sein de l'île la plus vaste, Grande Terre. En outre elle met en évidence un déficit en hétérozygotes au sein de certaines populations pouvant être attribué à une sous-structuration spatiale ou un régime de reproduction autogame. La variation de la taille des feuilles et des graines, caractères liés à l'adaptation, résulte des effets de dérive mais aussi de la sélection naturelle provoquée par des contrastes environnementaux liés à la pluviométrie. De même la composition chimique du bois de cœur, analysée par chromatographie, subirait, en plus de la dérive, une pression sélective exercée par le cortège d'insectes et de champignons phytophages. Cette étude exploratoire permet de dégager de nombreuses perspectives de recherche relevant des questions évolutives en milieu insulaire. Sur un plan opérationnel, elle permet de définir des unités de gestion de l'espèce associant caractères adaptatifs et variables moléculaires.

Mots clés: insularité, dérive, sélection, forces évolutives, adaptation, conservation, huiles essentielles, *Santalum austrocaledonicum*.

### **Title : Causes of molecular and phenotypic variability of an insular tree species : *Santalum austrocaledonicum* in New-Caledonia**

#### **Abstract**

Oceanic islands provide a "natural laboratory" to study the impact of the evolutionary forces on the biodiversity. The effects of genetic drift and the impact of the natural selection appear all the more exacerbated since the islands are isolated and subjected to strong environmental gradients. Our study associates neutral molecular markers and characters related to the adaptation in order to evaluate the influence of these various forces in the insular context of New Caledonia on the forest species *Santalum austrocaledonicum*. The study of the nuclear and chloroplastic microsattellites shows a clear differentiation of the populations of the small Loyauté islands and isolation by distance within the largest island, Grande Terre. Moreover our study highlights an heterozygote deficit within populations which can be allotted to a spatial sub-structure or selfing. The variation of the size of the leaves and seeds, which are related to adaptation, results from the effects of drift but also from natural selection caused by environmental contrasts related to rainfall. In the same way the chemical composition of heartwood, analysed by chromatography, would undergo, in addition to the drift, a selective pressure exerted by phytophagous insects and mushrooms. This exploratory raises many prospects for research concerning evolutionary questions and insularity. This study enables to define units of management of this species associating adaptive characters and molecular variables.

Keywords: insularity, drift, selection, evolutionary forces, adaptation, conservation, essential oils, *Santalum austrocaledonicum*.

CIRAD - Département forêt –

Unité de Recherche 39 « diversité génétique et amélioration des espèces forestières »

Campus international de Baillarguet TA 10/C

34398 MONTPELLIER cedex 5 France