HAL
open science

Diversité de Vanilla planifolia G. Jackson dans l'Océan Indien et de ses espèces apparentées : aspects génétiques, cytogénétiques et épigénétiques

Séverine Bory

To cite this version:

Séverine Bory. Diversité de Vanilla planifolia G. Jackson dans l'Océan Indien et de ses espèces apparentées : aspects génétiques, cytogénétiques et épigénétiques. Biologie végétale. Université de la Réunion, 2007. Français. NNT : . tel-00258207

HAL Id: tel-00258207

https://theses.hal.science/tel-00258207v1

Submitted on 21 Feb 2008

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.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Faculté des Sciences et Technologies

UMR « Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical »
CIRAD – Université de la Réunion

THÈSE

pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT

Discipline : Sciences
Formation Doctorale : Génétique
Ecole Doctorale Interdisciplinaire E.D.I. n°0445

Diversité de Vanilla planifolia G.Jackson dans l'Océan Indien et de ses espèces apparentées : aspects génétiques, cytogénétiques et épigénétiques

par

Séverine BORY

Soutenue le 17 décembre 2007 devant le jury composé de :

Michel DRON	Professeur, Université Paris Sud	Rapporteur
Patrick OLLITRAULT	Chercheur HDR, CIRAD Valencia	Rapporteur
André CHARRIER	Professeur Emérite, SupAgro Montpellier	Président du Jury
Michel NOIROT	Directeur de recherche, IRD Réunion	Examinateur
Thierry PAILLER	Maître de Conférences HDR, Université Réunion	Examinateur
Pascale BESSE	Professeur, Université Réunion	Directrice de Thèse

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION
Faculté des Sciences et Technologies
UMR « Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical »
CIRAD – Université de la Réunion

THÈSE

pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT

Discipline : Sciences
Formation Doctorale : Génétique
Ecole Doctorale Interdisciplinaire E.D.I. n°0445

Diversité de Vanilla planifolia G.Jackson dans l'Océan Indien et de ses espèces apparentées : aspects génétiques, cytogénétiques et épigénétiques

par

Séverine BORY

Soutenue le 17 décembre 2007 devant le jury composé de :

Michel DRON	*Professeur, Université Paris Sud*	*Rapporteur*
Patrick OLLITRAULT	*Chercheur HDR, CIRAD Valencia*	*Rapporteur*
André CHARRIER	*Professeur Emérite, SupAgro Montpellier*	*Président du Jury*
Michel NOIROT	*Directeur de recherche, IRD Réunion*	*Examinateur*
Thierry PAILLER	*Maître de Conférences HDR, Université Réunion*	*Examinateur*
Pascale BESSE	*Professeur, Université Réunion*	*Directrice de Thèse*

A mon frère Benjamin…

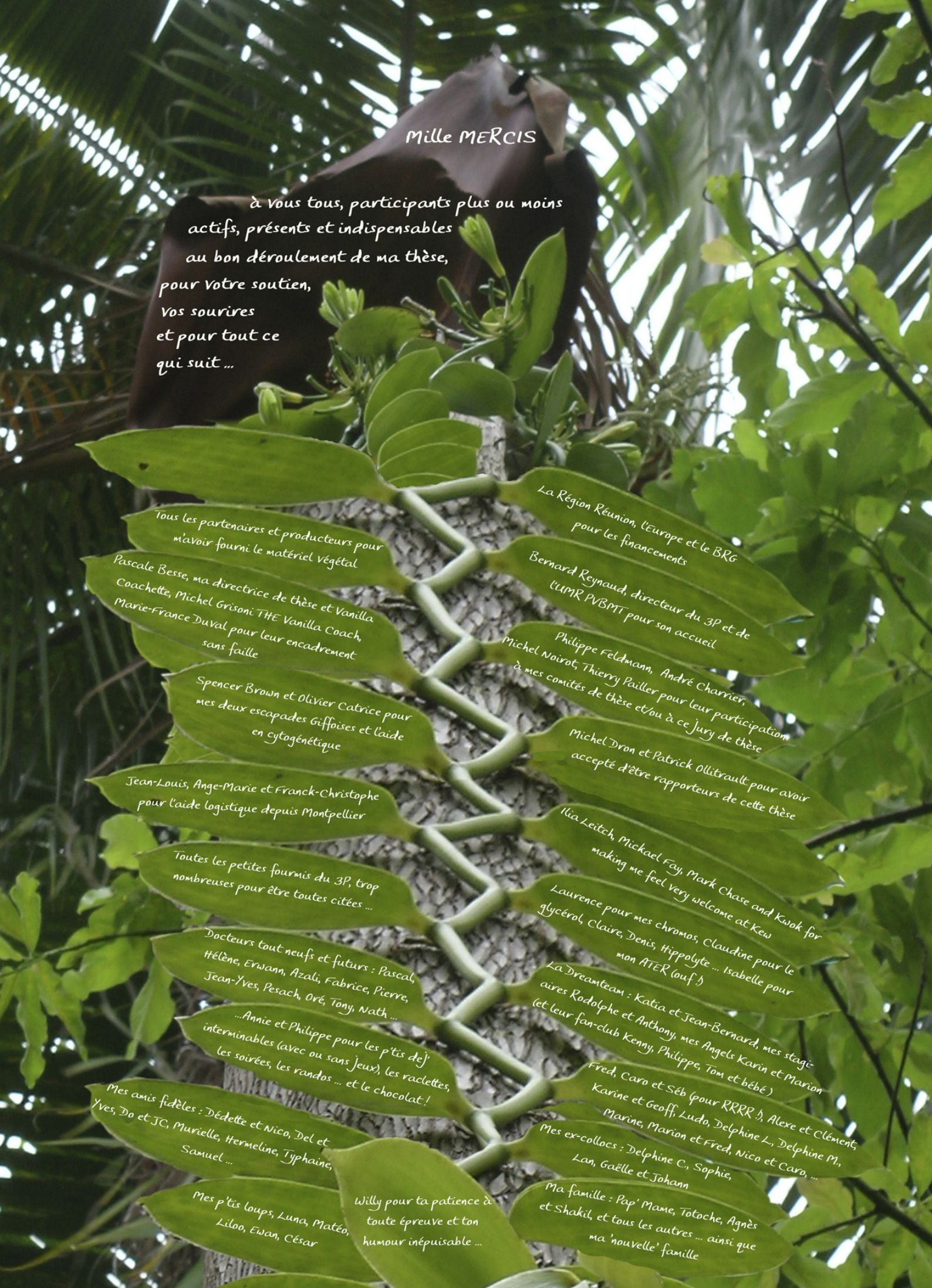

Mille MERCIS
à vous tous, participants plus ou moins actifs, présents et indispensables au bon déroulement de ma thèse, pour votre soutien, vos sourires et pour tout ce qui suit ...
La Région Réunion, l'Europe et le BRG pour les financements
Bernard Reynaud, directeur du 3P et de l'UMR PVBMT pour son accueil
Philippe Feldmann, André Charrier, Michel Noirot, Thierry Pailler pour leur participation à mes comités de thèse et/ou à ce jury de thèse
Michel Dron et Patrick Ollitrault pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse
Ilia Leitch, Mickael Fay, Mark Chase and Kwok for making me feel very welcome at Kew
Laurence pour mes chromos, Claudine pour le glycérol, Claire, Denis, Hippolyte ... Isabelle pour mon ATER (ouf !)
La Dreamteam : Katia et Jean-Bernard, mes stagiaires Rodolphe et Anthony, mes Angels Karin et Marion (et leur fan-club Kenny, Philippe, Tom et bébé)
Fred, Caro et Séb (pour RRRR !), Alexe et Clément, Karine et Geoff, Ludo, Delphine L., Delphine M., Marine, Marion et Fred, Nico et Caro, ...
Mes ex-collocs : Delphine C., Sophie, Lan, Gaëlle et Johann
Ma famille : Pap' Mame, Totoche, Agnès et Shakil, et tous les autres ... ainsi que ma 'nouvelle' famille
Willy pour ta patience à toute épreuve et ton humour inépuisable ...
Tous les partenaires et producteurs pour m'avoir fourni le matériel végétal
Pascale Besse, ma directrice de thèse et Vanilla Coachette, Michel Grisoni THE Vanilla Coach, Marie-France Duval pour leur encadrement sans faille
Spencer Brown et Olivier Catrice pour mes deux escapades Giffoises et l'aide en cytogénétique
Jean-Louis, Ange-Marie et Franck-Christophe pour l'aide logistique depuis Montpellier
Toutes les petites fourmis du 3P, trop nombreuses pour être toutes citées ...
Docteurs tout neufs et futurs : Pascal, Hélène, Erwann, Azali, Fabrice, Pierre, Jean-Yves, Pesach, Oré, Tony, Nath ...
...Annie et Philippe pour les p'tis dej' interminables (avec ou sans jeux), les raclettes, les soirées, les randos ... et le chocolat !
Mes amis fidèles : Dédette et Nico, Del et Yves, Do et JC, Murielle, Hermeline, Typhaine, Samuel ...
Mes p'tis loups, Luna, Matéo, Liloo, Ewan, César

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS **1**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **3**

I. LA VANILLE : DONNEES AGRONOMIQUES **3**
II. LA VANILLE : DONNEES ECONOMIQUES **5**
III. LA VANILLE : INTERET DES RESSOURCES GENETIQUES **7**
IV. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE **8**

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **10**

I. PREAMBULE **10**

Article N°1 : Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge *11*

Abstract 12
Introduction 12
Vanilla taxonomy and phylogeny 13
Vanilla *within the Orchidaceae* *13*
Distribution *13*
Taxonomy and phylogeny *13*
The Vanilla *genus* *14*
The genus organization *14*
Phylogenetic relationships among Vanilla *species* *19*
The origin of V. tahitensis *20*
Reproductive biology 21
The reproduction of American vanilla in natural conditions *21*
Inter-specific hybridization *22*
V. planifolia in its area of origin 22
The history of V. planifolia *in Mexico* *22*
Vanilla diversity in Mexico *23*
V. planifolia in introduction areas 24
V. planifolia *dissemination from its area of origin* *24*
V. planifolia *diversity in introduction areas* *24*
Phenotypic diversity in Reunion Island *24*
Possible origins of this phenotypic diversity *26*
Preservation of vanilla genetic resources 28
Conclusions 29
References 30

II. CONCLUSIONS DE L'INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **33**

CHAPITRE 2 : ANALYSE GÉNÉTIQUE **35**

I. PREAMBULE **35**

Article N°2 : Patterns of introduction and diversification of **Vanilla planifolia** *(Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean)* *37*

A2.1. Abstract 39
A2.2. Introduction 39
A2.3. Materials and methods 43
A2.3.1. Plant material and DNA extraction *43*
A2.3.2. AFLP assay *44*
A2.3.3. Data analysis *45*
A2.3.4. Reproducibility *46*
A2.4. Results 46
A2.4.1. Interspecific AFLP diversity *46*
A2.4.2. Intraspecific AFLP diversity *47*
A2.5. Discussion 49
A2.5.1. Patterns of introduction of V. planifolia *in Reunion Island* *49*
A2.5.2. V. pompona*: another case of a limited introduction event in Reunion Island* *50*
A2.5.3. Patterns of diversification of V. planifolia *in Reunion Island* *51*
A2.5.4. Perspectives for vanilla breeding *54*
A2.5.5. Conclusions *54*
Acknowledgements 56

Article N°3 : Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: polymorphism and transferability to other **Vanilla** *species* *57*

Abstract 58
1. Introduction 58
2. Materials and methods 59
3. Results 61
4. Discussion 61
Acknowledgements 62
References 62

II. APPORT COMPLEMENTAIRE DES MICROSATELLITES POUR L'ANALYSE GENETIQUE 64

II.1. Introduction 64
II.2. Matériel et méthodes 65
II.2.1. Matériel végétal *65*
II.2.2. Analyse microsatellite *66*
II.3. Résultats 67
II.3.1. Précisions des résultats de l'analyse AFLP : identification des échantillons inconnus (SP) .. *67*
II.3.2. Intérêt du marqueur mVplCIR031 pour la phylogéographie *69*
II.4. Discussion 70
II.4.1. Diversité intraspécifique *70*
II.4.2. Hybrides artificiels *71*
II.4.3. Mise en évidence du rôle de l'hybridation dans l'évolution du genre Vanilla *71*
II.4.4. Accessions restantes non identifiées *72*
II.4.5. Phylogéographie dans le genre Vanilla *73*

III. CONCLUSIONS DE L'ANALYSE GENETIQUE 75

CHAPITRE 3 : ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE **77**

I. PREAMBULE **77**

Article N°4 : Natural polyploidy in **Vanilla planifolia** *(Orchidaceae)* *79*

A4.1. Abstract 81
A4.2. Introduction 82
A4.3. Materials and methods 83
A4.3.1. Plant material *83*
A4.3.2. Determination of DNA content by flow cytometry *83*
A4.3.3. Determination of DNA content by Feulgen microdensitometry *84*
A4.3.4. Determination of chromosome number *85*
A4.3.5. Measurement of stomatal length *85*
A4.3.6. Data analysis *86*
A4.4. Results 86
A4.4.1. Flow cytometry *86*
A4.4.2. Feulgen microdensitometry *87*
A4.4.3. Determination of chromosome number *87*
A4.4.4. Measure of stomatal length *88*
A4.4.5. Relationship between DNA content, chromosome number and stomatal length *88*
A4.5. Discussion 88
A4.5.1. V. planifolia *2C DNA content* *88*
A4.5.2. Endoreplication *90*
A4.5.3. Somatic aneuploidy *90*
A4.5.4. Polyploidy in V. planifolia *91*
A4.5.5. Impact of polyploidy on morphology *92*
A4.5.6. Origin of polyploidy in V. planifolia *93*
A4.5.7. Conclusion and perspectives *95*
Acknowledgements 96

Article N°5 : **Vanilla pompona** *(Orchidaceae) is an ancient polyploid species* *97*

A5.1. Abstract 99
A5.2. Introduction 100
A5.3. Material and methods 101
A5.3.1. Plant material *101*
A5.3.2. Cytogenetic analyses *101*
A5.3.3. Morphological analysis *102*
A5.3.4. Data analysis *102*
A5.4. Results 103
A5.4.1. Flow cytometry *103*
A5.4.2. Determination of chromosome number *103*
A5.4.3. Measure of stomatal length *104*
A5.4.4. Morphological analysis *104*
A5.4.5. Hierarchical clustering of V. pompona *accessions* *105*
A5.5. Discussion 106

A5.5.1. 2C DNA content in V. pompona *106*
A5.5.2. Somatic aneuploidy and chromosome numbers in V. pompona *107*
A5.5.3. V. pompona*: a polyploid species* *107*
A5.5.4. Two groups (genetic, phenotypic, and cytogenetic) are revealed in V. pompona *108*
A5.5.5. Different behaviour between V. planifolia *and* V. pompona *108*
A5.5.6. Conclusion and perspectives *109*
Acknowledgements 110
II. ANALYSE CYTOGENETIQUE DES AUTRES ESPECES DU GENRE VANILLA 111
II.1. Introduction 111
II.2. Matériel et méthodes 112
II.2.1. Matériel végétal *112*
II.2.2. Analyses cytogénétiques *112*
II.2.3. Analyse des données *113*
II.3. Résultats 113
II.3.1. Cytométrie en flux *113*
II.3.2. Détermination du nombre chromosomique *114*
II.3.3. Relation entre nombre chromosomique et quantité d'ADN nucléaire *114*
II.4. Discussion 115
II.4.1. Aneuploidïe somatique et nombre chromosomique dans le genre Vanilla *115*
II.4.2. Quantité d'ADN nucléaire dans le genre Vanilla *115*
II.4.3 Polyploïdie dans le genre Vanilla *116*
III. RESULTATS COMPLEMENTAIRES PRELIMINAIRES DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE : COMPTAGES CHROMOSOMIQUES, VIABILITE ET GERMINATION AU NIVEAU DU POLLEN 119
III.1. Introduction 119
III.1.1. Formation des grains de pollen *119*
III.1.2. Mécanismes d'autostérilité *120*
III.2. Matériel et méthodes 121
III.2.1. Observation préliminaire des chromosomes dans le pollen *121*
III.2.2. Viabilité des grains de pollen *122*
III.2.3. Evaluation du pouvoir germinatif *122*
III.2.4. Analyse des données *122*
III.3. Résultats 123
III.3.1. Observation préliminaire des chromosomes sur pollen *123*
III.3.2. Viabilité des grains de pollen *124*
III.3.3. Evaluation du taux de germination *124*
III.4. Discussion 125
III.4.1. Observation des chromosomes dans le pollen *125*
III.4.2. Influence de la triploïdie sur la viabilité pollinique *126*
IV. CONCLUSIONS DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE 129

CHAPITRE 4 : ANALYSE ÉPIGÉNÉTIQUE 131

I. INTRODUCTION 131
II. MATERIEL ET METHODES 134

II.1. Matériel végétal et extraction d'ADN 134
II.2. Analyse MSAP 134
II.3. Analyse des données 136
III. RESULTATS 137
IV. DISCUSSION ET CONCLUSION 138

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 143

I. CONCLUSIONS 143
II. PERSPECTIVES 145

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 147

ANNEXES 161

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abréviations scientifiques

ADN (DNA)	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism ; polymorphisme de longueur de fragments amplifiés
*atp***B**	Gène chloroplastique codant pour la sous-unité alpha de l'ATPase membranaire
cv.	Cultivar
CMV	*Cucumber mosaic virus*
CMS	Cytoplasmic Male Sterility ; stérilité mâle cytoplasmique
CymMV	*Cymbidium mosaic virus*
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique
FAM	6-carboxyfluoresceine
GSI	Gametophytic Self-Incompatibility ; auto incompatibilité gamétophytique
HCl	Acide Chlorhydrique
ITS	Internal Transcribed Spacer ; espaceur interne transcrit des ADN ribosomiques
IRAP	Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism ; polymorphisme amplifié inter-rétrotransposons
MATAB	Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide
*mat***K**	Gène (anciennement appelé *orf*K) situé dans l'intron du gène chloroplastique *trn*K, sur la grande section simple copie, adjacente à la répétition inversée.
MSAP	Methylation Sensitive Amplified Polymorphism ; polymorphisme de sensibilité à la méthylation
NJ	Neighbor-Joining
NMS	Nuclear Male Sterility ; stérilité mâle nucléaire (génique)
ORSV	*Odontoglossum ringspot virus*
PCR	Polymerase Chain Reaction ; réaction de polymérisation en chaîne
*psa***B**	Gène chloroplastique codant pour les polypeptides du photosystème I
*psb***B**	Gène chloroplastique codant pour une sous-unité de la protéine 680 du photosystème II
*psb***C**	Gène chloroplastique codant pour une sous-unité de la protéine 680 du photosystème II
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA ; ADN polymorphe amplifié aléatoirement
REMAP	REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism ; polymorphisme amplifié microsatellites-rétrotransposons
*rbc***L**	Gène chloroplastique codant pour la grosse sous-unité de la protéine ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco)
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid ; acide ribonucléique ribosomique
sp.	Espèce
SSI	Sporophytic Self-Incompatibility ; auto incompatibilité sporophytique
SSR	Simple Sequence Repeat ; microsatellite
TCG	Taxonomically Complex Group ; groupe d'organismes taxonomiquement complexes
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane
*trn***L-F**	Région chloroplastique incluant un intron et un espaceur flanquant l'exon 3 du gène *trn*L
U	Unité

Autres abréviations

AMO	Asociación Mexicana de Orquídeas
B.C.	Before Christ
BRG	Bureau des Ressources Génétiques

CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Ensenañza
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CITRO	Centro de Investigaciones Tropicales
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
DAP	Développement et Amélioration des Plantes
DEA	Diplôme d'Etudes Approfondies
IISR	Indian Institute of Spices Research
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IRAM	Institut de Recherches Agronomiques à Madagascar
IRAT	Institut de Recherches Agronomiques Tropicales
FOFIFA	Foibem-pirenena ho an'ny fikarohana ampiharina ho fampandrosoana ny eny Ambanivohitra, devenu Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural (CENRADERU)
EVT	Etablissement Vanille de Tahiti
IBP	Institut de Biotechnologie des Plantes
IGP	Indication Géographique Protégée
IRD	Institut pour la Recherche et pour le Développement
MA	Millions d'années
MNHN	Muséum National d'Histoire Naturelle
MT	Metric tons
MTA	Material Transfer Agreement ; accord de transfert de matériel
Mya	Million years
NRCS	National Research Centre for Spices
PRIL	Plant Resources Informatics Laboratory
PVBMT	Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
SPC	Secretary of the Pacific Community
UCR	University of California Riverside
UMR	Unité Mixte de Recherche
UPR	Unité Propre de Recherche

Unités

bp	basepairs
pb	paire de bases
ha	hectare
g	gramme
kg	kilogramme
µL	microlitre
ng	nanogramme
pg	picogramme
km	kilomètre
M	molaire
mM	millimolaire
N	Normalité
nM	nanomolaire
µM	micromolaire
h	heure
min	minute

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Extrait de *The Badianus Manuscript*. Illustration de Emily Walcott Emmart. Baltimore. The Johns Hopkins Press. 1940. Planche 104.
Traduction du *Codex Badianus*. 1552.

Extrait du *Codex Florentinus*, par Fr. Bernardino de Sahagun. Library Medicea Laurentiana, Florence. 1577. Texte en Nahuatl.

Figure 1.1 : Répartition mondiale des 110 espèces du genre *Vanilla* selon Portères (1954).

Figure 1.2 : Variabilité morphologique des feuilles du genre *Vanilla* : (a) *V. sp.* SP0102, (b) *V. pompona* PO0047, (c) *V. humblotii* HU0108, (d) *V. sp.* SP0117, (e) *V. sp.* SP0682, (f) *V. imperialis* IM0104, (g) *V.* cf. *barbellata* SP0081, (h) *V. bahiana* BA0086, (i) *V. africana* AF0103, (j) *V. planifolia* PL0035, (k) *V. pompona* PO0018. Clichés : M. Grisoni.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. La vanille : données agronomiques

La vanille est la deuxième épice la plus chère après le safran et elle est appréciée dans le monde entier. Elle est utilisée comme arôme et parfum dans les industries agro-alimentaires, en cosmétique et en parfumerie. La vanille naturelle est exclusivement produite à partir des fruits aromatiques d'espèces du genre *Vanilla*. Le genre *Vanilla* appartient à la très ancienne famille des Orchidaceae et comprend entre 90 et 110 espèces réparties dans la zone inter-tropicale, sur les trois continents Amérique, Afrique, Asie, à l'exception de l'Australie (Portères, 1954; Soto Arenas, 2003). La plupart des espèces sont originaires d'Amérique tropicale (52), puis d'Asie du sud-est et de Nouvelle-Guinée (31), d'Afrique (17), des îles de l'Océan Indien (7) et de l'Océan Pacifique (3) (Portères, 1954) (Figure 1.1).

Le vanillier est une liane pérenne, à croissance monopodiale, généralement terrestre mais parfois épiphyte ou semi-épiphyte (Annexe 1). Elle s'accroche à un support grâce à des racines adventives, ou crampons, produites à chaque nœud de la tige. La tige est cylindrique, verte et charnue. Les feuilles, attachées à la tige par un court pétiole, sont alternes, vert clair à vert foncé, glabres, membraneuses, coriaces ou charnues pour les espèces foliées, et semblables à des écailles ou inexistantes pour les espèces aphylles (Figure 1.2). L'inflorescence naît à l'aisselle des feuilles, en forme de racème, parfois de panicule et plus rarement de cyme complexe. Les fleurs, présentant des formes et des couleurs différentes selon les espèces (Figure 1.3), sont résupinées et comportent trois sépales et trois pétales (caractéristiques des orchidées), dont l'un, en forme de cornet et appelé labelle, est soudé à la colonne (portant un stigmate et une étamine). Les fleurs sont parfois fortement odorantes, produites l'une après l'autre dans l'inflorescence, et sont très éphémères. Les fleurs s'ouvrent pendant moins de 12 heures mais les gamètes sont actifs pendant 48 heures (Shadakshari *et al.*, 2003). Après fécondation, l'ovaire se transforme en une capsule, appelée à tort gousse, déhiscente ou non,

Figure 1.3 : Variabilité morphologique des fleurs du genre *Vanilla* : (a) *V. africana* AF0103[1], (b) *V. albida* AL0059[1], (c) *V. aphylla*[2], (d) *V. bahiana* BA0086[1], (e) *V. barbellata*[3], (f) *V. claviculata*[4], (g) *V. cribbiana*[5], (h) *V. humblotii*[6], (i) *V. imperialis*[7], (j) *V. inodora*[5], (k) *V. insignis*[5], (l) *V. madagascariensis*[8], (m) *V. odorata*[5], (n) *V. palmarum* PA0083[1], (o) *V. perrieri*[5], (p) *V. planifolia*[1], (q) *V. polylepis*[7], (r) *V. pompona* PO0047[1], (s) *V. sp.* SP0091[1], (t) *V. tahitensis* TA0017[1]. Clichés : [1]M. Grisoni, [2]©OrchidFoto.com 2006, [3]http://www.sdahldtp.com/vbarbellata.htm, [4]©Natural Selections Exotics www.NSExotics.com, [5]M.A. Soto Arenas (2006), [6]F. Bertholat, [7]DR, [8]E. Marinot.

de forme plus ou moins cylindrique (Figure 1.4) et renfermant plusieurs milliers de graines (Stehlé, 1952; Portères, 1954; Soto Arenas, 2003). La gousse mûre (verte) est préparée selon un processus de transformation traditionnel nécessitant des étapes d'échaudage, d'étuvage, de séchage et d'affinage (Odoux, 2005). Il faut environ 4 kg de vanille mûre (verte) pour obtenir 1 kg de vanille préparée (noire).

Dans les zones d'introduction, en raison de l'absence des pollinisateurs naturels, la pollinisation artificielle est de rigueur. La morphologie particulière de la fleur rend l'autofécondation naturelle impossible, sauf pour quelques espèces comme *V. palmarum* et *V. inodora* (Soto Arenas, 2003). En effet, une petite membrane, le rostellum, empêche le pollen d'entrer en contact avec le stigmate. Un procédé simple de pollinisation artificielle a été découvert par l'esclave Edmond Albius en 1841 à La Réunion et est toujours utilisé dans les plantations. Au moyen d'un outil pointu, on soulève délicatement le rostellum et on le place derrière les pollinies. Ensuite, on rabat le pollen sur le stigmate et on appuie pour qu'il y reste collé (Figure 1.5). A cause de cette structure florale, la reproduction sexuée est rarement observée en conditions naturelles. La multiplication végétative est donc le mode de reproduction prédominant du vanillier (Portères, 1954).

La culture de la vanille est respectueuse de l'environnement car aucun intrant de synthèse n'est utilisé ou très peu. Elle est une source d'emploi pour les pays à faible pouvoir d'achat car elle nécessite une main d'œuvre importante pour la pollinisation, la récolte et la transformation. Il existe trois systèmes de culture du vanillier plus ou moins élaborés (Figure 1.6). La culture extensive ou culture en sous-bois est le système le plus répandu à travers le monde. Les lianes sont cultivées sur des tuteurs et un substrat naturels. La production moyenne excède rarement quelques dizaines de grammes par tuteur. La culture semi-intensive en plein champ est un système où le milieu est amélioré par l'apport de matières organiques et de tuteurs vivants plus adaptés. Elle se fait généralement en association avec d'autres cultures (agroforesterie, ou canne à sucre à La Réunion). La production moyenne est de 100 à 500 g par tuteur. Enfin, la culture intensive est un système où la vanille est placée sous ombrière et sur tuteurs artificiels pour une

Figure 1.4 : Variabilité morphologique des gousses du genre *Vanilla* : (a) *V. planifolia* PL0627[1], (b) *V. pompona* PO0047[1], (c) *V. bahiana* BA0086[1], (d) *V. humblotii*[2], (e) *V. sp.* SP0682[1], (f) *V. sp.* SP0091[1]. Clichés : [1]M. Grisoni, [2] F. Bertholat.

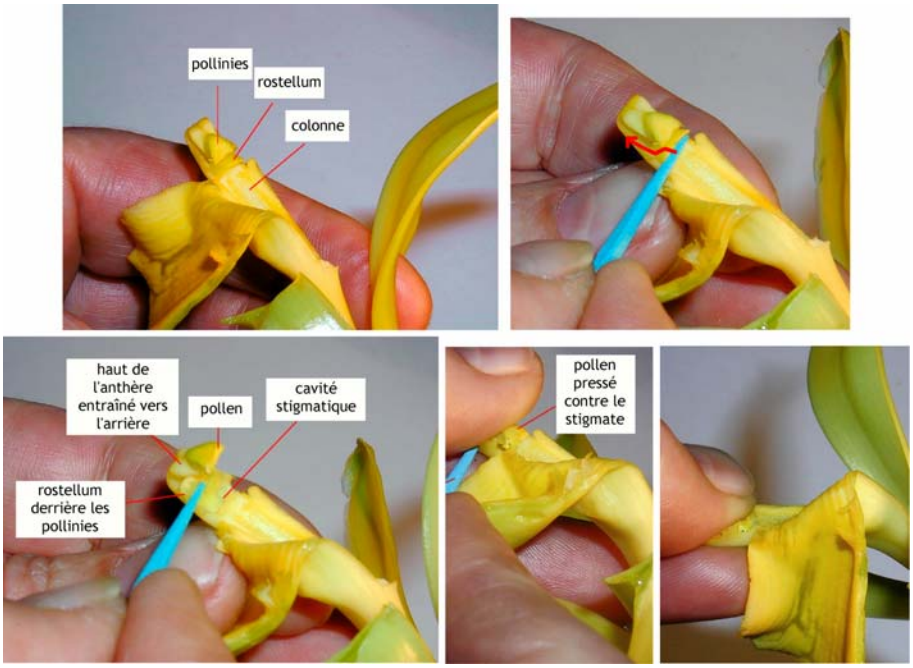


Figure 1.5 : Les différentes étapes de la pollinisation artificielle telle qu'elle est pratiquée dans les zones de culture du vanillier. Source : http://www.sdahldtp.com/pollinate.htm.

meilleure gestion des conditions de culture permettant d'accroître la production de façon spectaculaire. La production peut atteindre 1 kg par tuteur (Weiss, 2002; Le Bellec, 2005).

Des maladies fongiques attaquent le vanillier, comme la fusariose (genre *Fusarium*), le mildiou (genre *Phytophthora*) et l'anthracnose (genre *Glomerella*). De bonnes pratiques culturales et quelques fongicides permettent d'en limiter l'impact mais elles provoquent malgré cela des pertes considérables au champ (Stehlé, 1952; Dequaire, 1976; Lucas, 1990). Onze virus infectent les vanilliers, et appartiennent à cinq genres : le Potexvirus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), sept *Potyvirus*, le Cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV), le Tobamovirus *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) et un Rhabdovirus. L'incidence des viroses est exacerbée par la multiplication végétative et le système de culture intensif. La seule méthode de lutte contre ces virus est la prophylaxie (Farreyrol *et al.*, 2001; Leclerc-Le Quillec *et al.*, 2001; Grisoni *et al.*, 2004; Farreyrol, 2005).

II. La vanille : données économiques

Entre 18 et 35 espèces de *Vanilla* produisent des fruits aromatiques et parmi elles, deux sont cultivées : *V. planifolia* G. Jackson, représentant à elle seule plus de 95% de la production mondiale actuelle, et *V. tahitensis* J.W. Moore, qui ne fournit que 50 tonnes sur le marché international. Originaire du sud-est du Mexique, *V. planifolia* est actuellement cultivée en Amérique Centrale et aux Antilles, dans les îles de l'Océan Indien, en Ouganda, en Indonésie, en Inde et dans les îles du Pacifique. L'espèce *V. tahitensis* est cultivée essentiellement dans l'Océan Pacifique, en Polynésie française, en Papouasie Nouvelle-Guinée et aux îles Cook et Niue. Quelques autres espèces aromatiques sont exploitées localement mais ont une importance économique mineure (Portères, 1954; Soto Arenas, 2003).

Les espagnols ont disséminé *V. planifolia* du Mexique jusqu'en Europe dans un premier temps puis dans toutes les colonies aux XVIIIe et XIXe siècles mais sans pouvoir toutefois produire les précieux fruits. Grâce à la découverte du procédé

Figure 1.6 : Les différents systèmes de culture rencontrés dans les zones de culture du vanillier : (a) culture extensive en sous-bois (St-Philippe, La Réunion), (b) culture semi-intensive sur *Glyricidia maculata* (Huahine, Polynésie française), (c) culture intensive sous ombrière (CIRAD, La Réunion). Clichés : M. Grisoni.

Tableau 1.1 : Production mondiale de gousses de vanille en 2001 (en tonnes, hors réexportation des pays non producteurs) (Loeillet, 2003).

Pays producteur	**2001**
Madagascar	1448
Indonésie	475
Comores	205
Ouganda	76
Inde	27
Papouasie Nouvelle-Guinée	13
Autres pays	40
Total	**2284**

Tableau 1.2 : Importation mondiale des gousses de vanille en 2001 (en tonnes) (Loeillet, 2003).

Pays importateur	**2001**
USA	1445
Union Européenne	707
Japon	71
Autres pays	61
Total	**2284**

simple de pollinisation artificielle, la culture s'est répandue à partir de l'Océan Indien et la production s'est développée dans le monde. La production mondiale de la vanille est difficile à estimer, en raison des contradictions et de l'opacité qui règnent sur ce marché très spéculatif. En 2001, Madagascar était le principal producteur de vanille occupant les deux tiers du marché, suivi par l'Indonésie, les Comores, l'Ouganda et l'Inde, assurant à eux quatre 34% du marché. Les autres pays représentaient 1% du marché : Jamaïque, Papouasie Nouvelle-Guinée, Chine, Polynésie française, Tonga, Mexique, Réunion, Maurice, Costa Rica, Vanuatu et Taiwan (estimations de 2001, Tableau 1.1).

Les principaux pays consommateurs sont les Etats-Unis, important deux tiers de la production mondiale, l'Union Européenne, dont la France est le principal importateur (258 tonnes en 2001) et le Japon (Tableau 1.2).

Compte tenu de la position prépondérante de Madagascar dans la production mondiale, les cours sont entièrement dépendants de la situation de ce pays. Depuis une dizaine d'années, le marché malgache est fortement instable (crises politiques, cyclones) autant en terme de volume, de prix, que de qualité de la vanille. Ceci a stimulé l'arrivée sur le marché de nouveaux pays comme l'Inde, l'Ouganda, l'Indonésie et la Papouasie Nouvelle-Guinée. Leurs productions varient énormément en fonction de la conjoncture de chaque pays. Ainsi, la Papouasie Nouvelle-Guinée est passée de 13 tonnes de vanille noire produites en 2001 à environ 200 tonnes en 2005 (Brownell, 2006) et les Comores produisent aujourd'hui moins de 100 tonnes (contre 205 tonnes en 2001, M. Grisoni, com. pers.). Cependant cette augmentation de l'offre, parfois au détriment de la qualité, s'est accompagnée récemment d'une diminution de la demande, car les utilisateurs se sont détournés de la vanille naturelle en raison des hausses de prix exorbitantes (jusqu'à 400 €/kg en 2003-2004), au profit de la vanilline de synthèse. Les prix évoluent actuellement aux alentours de 35 €/kg. Le marché mondial de la vanille peut donc se résumer ainsi : cours très fluctuants hautement spéculatifs, matière première de qualité variable et concurrence des vanillines de synthèse ou de biosynthèse.

La Réunion a longtemps été un important producteur de vanille, mais la production a diminué drastiquement, passant de 100 tonnes de vanille noire dans les années 1960 à environ 7 tonnes ces dernières années. Le renchérissement de la main d'œuvre, la baisse des cours mondiaux de la vanille et l'offre de prix garantis sur la canne à sucre sont à l'origine de ce déclin. La Réunion compte à l'heure actuelle un peu plus de 200 producteurs cultivant une surface totale de 300 ha de vanille. La majeure partie est plantée selon un mode d'exploitation extensif en sous-bois (95%), plus rarement en plein champ (4%) et en intensif sous ombrière (1%). Le prix de vente moyen à La Réunion avoisine les 500 €/kg ce qui ne la rend guère compétitive sur le marché international. La vanille réunionnaise est essentiellement commercialisée sur le marché local en vente directe aux touristes. En raison de la concurrence de vanilles d'importation moins chères (> 50% du marché local) et afin de conforter l'image de marque de La Réunion (agro-tourisme), une indication géographique protégée (IGP) est mise en place.

III. La vanille : intérêt des ressources génétiques

Comme beaucoup d'autres espèces tropicales introduites pour leur culture, le vanillier possède une base génétique très restreinte qui le rend notamment vulnérable aux maladies. Chez une plante d'importance économique comme le vanillier, l'accroissement de la variabilité génétique et l'apport de nouvelles potentialités (résistances aux maladies, virus et ravageurs, qualité des gousses, performances agronomiques) sont donc des enjeux majeurs pour la recherche.

En raison de l'accès difficile aux ressources génétiques de la vanille, de nombreuses initiatives de préservation de ces ressources ont vu le jour dans le même temps à La Réunion, en Polynésie française, en Inde et au Mexique. Depuis 2003 au CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) à St-Pierre (La Réunion) est mise en place une collection des ressources génétiques du vanillier la plus large et diversifiée possible. Adossée au laboratoire de génétique de l'UMR PVBMT (Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical), cette collection a pour vocation de devenir une

référence internationale. Elle a été constituée à partir du matériel détenu en propre par le CIRAD, par des prospections, et enrichie par les contributions de nombreux partenaires institutionnels ou privés comme le Muséum National d'Histoire Naturelle, la Communauté du Pacifique Sud, des jardins botaniques, des producteurs de vanille, des associations orchidophiles. Les objectifs de cette collection sont : (i) établir une collection de vanilliers d'origines géographiques diverses, (ii) déterminer les caractéristiques morphologiques, agronomiques, biochimiques et moléculaires de chaque clone ainsi que leur sensibilité à différents agents pathogènes, (iii) maintenir la collection dans des conditions de certification sanitaire et de production idéales, (iv) produire un doublon *in vitro* à des fins de sauvegarde, de multiplication et de diffusion du matériel végétal, et enfin (v) mettre en place un programme d'amélioration variétale en vue d'améliorer la productivité (rendement et qualité aromatique) et la résistance aux maladies (Grisoni *et al.*, 2007). En effet, ces ressources génétiques constituent une source de caractères agronomiques intéressants pour générer des hybrides aptes à l'autopollinisation, résistants à la sécheresse et aux maladies, nécessitant moins de photopériode pour la floraison, pouvant produire des gousses plus grosses, indéhiscentes et avec un meilleur profil aromatique (Soto Arenas, 1999b; Minoo *et al.*, 2006a).

IV. Problématique et objectifs de la thèse

Mon travail de thèse a débuté au cours d'un large projet national, financé par le Bureau des Ressources Génétiques (BRG), sur l'étude de l'origine génétique et épigénétique de la diversité observée dans des zones de dispersion secondaires récentes chez le vanillier, plante à multiplication végétative prédominante. Ma thèse a donc été réalisée en collaboration avec différentes équipes du CIRAD, avec l'Université de La Réunion, l'Université de Paris XI et l'Etablissement Vanille de Tahiti (EVT, Polynésie française). D'autres collaborations ont vu le jour, comme avec l'Université de California Riverside (USA), l'Université de College Cork (Irlande), le Jodrell Laboratory du Royal Botanical Gardens Kew (UK), le MNHN de

Paris et le CNRS de Gif-sur-Yvette. Ce projet de thèse a été financé par le BRG, le Conseil Régional de La Réunion et le Fonds Social Européen.

La taxonomie et la phylogénie du genre *Vanilla* sont encore très confuses et la diversité des différents pools génétiques est mal connue. En particulier, une certaine diversité phénotypique a été observée dans les zones d'introduction en condition de reproduction végétative quasi exclusive et en absence de leur pollinisateur naturel, à La Réunion pour *V. planifolia* comme en Polynésie pour *V. tahitensis*. Cependant, l'origine de cette variabilité phénotypique est inconnue. Ce projet de thèse a donc été mis en place afin de permettre une caractérisation des ressources génétiques du vanillier avec pour modèle d'étude particulier les *V. planifolia* de l'île de La Réunion. La question majeure soulevée est d'élucider les éventuels mécanismes à l'origine de la variabilité phénotypique rencontrée dans cette zone d'introduction. Cette étude s'appuie aussi plus largement quand cela est nécessaire sur une étude comparative avec d'autres modèles cultivés (*V. tahitensis*) ou spontanés (*V. pompona, V. bahiana*).

Mon mémoire de thèse est articulé en quatre parties. Le premier chapitre consiste en une introduction bibliographique, valorisée sous la forme d'un article publié, présentant l'état actuel des connaissances sur la biodiversité de la vanille et les recherches internationales liées à la phylogénie et à la diversité du genre *Vanilla*. Plusieurs hypothèses de travail faisant appel à différents domaines (génétique, cytogénétique ou épigénétique) ont été avancées à la suite de cette revue bibliographique pour expliquer les variations phénotypiques observées dans les zones d'introduction en l'absence de pollinisateurs naturels et elles sont alors testées dans les chapitres suivants.

Chapitre 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Vanille.

Voici la derniére Plante décrite par le R. P. Labat, elle se sent de la main qui l'a tracée, je veux dire qu'elle n'est pas plus exacte que toutes les autres.

1°. Je me récrie d'abord contre la ressemblance, qu'il trouve entre sa feüille & celle du Laurier (je dis même pour la figure) car, quant au reste, lui-même il convient qu'elle est bien plus longue, plus large, plus épaisse, & plus charnuë que celle-ci. Voici la preuve.

C'est que celle-là est pointuë par les deux bouts, sans queüe, & saisissant sa tige par son talon évasé, & qu'elle est formée par quantité de filaments, cintrés, qui regnent depuis l'onglet jusqu'à l'autre extrémité, & qu'au contraire celle-ci est arrondie vers la queüe, & plus pointüe à la cime.

2°. Je soutiens que ce n'est point une simple supposition, mais un fait constant aujourd'hui, qu'il y a pour le moins trois sortes de Vanille. Eh! qui pourroit en douter, depuis que le R. P. Plumier, d'une exactitude infinie en fait de Botanique, les a si bien distinguées & caractérisées en cette maniére.

L'une porte une fleur verte & blanche, son fruit est une silique étroite, & longuete, de couleur tirant sur le noir. L'autre produit des fleurs violettes, qui sont suivies d'un fruit plus court, & plus rougeâtre. Enfin la troisiéme pousse des fleurs blanches, dont la gousse est aussi courte, plus large, & d'un rouge de Coral.

Rapportons maintenant la description que chacun de ces Botanistes en a fait. Je commence par celle du R. P. L. c'est ainsi qu'il s'exprime.

„ La fleur que produit la Vanille est presque jaune, (assûrément il ne l'a consi-
„ derée que lorsqu'elle étoit flétrie ou fannée) partagée en cinq feüilles (il a oub-
„ lié celle du milieu) plus longues que larges, ondées, & un peu découpées dans
„ leur milieu. Du centre, il s'éleve un petit pistil rond, & assés pointu, qui s'al-
„ longe & se change en fruit. (à vrai dire, ces deux termes, pistil rond & assés
„ pointu ne conviennent guère ensemble.) „

Cette fleur est, à peu près, de la grandeur & de la consistence de celle des Pois communs. Il n'y a nulle justesse dans cette comparaison, ces deux espéces de fleurs étant extrémement différentes.

Ecoutons à present le R. P. Plumier. " La fleur de la Vanille est composée de
„ six fleurons, dont il y en a cinq assés semblables, lesquels sont ridés, contournés
„ , & disposés en rond. La sixiéme qui a la figure d'une éguiére, occupe le milieu :
„ après qu'elle est tombée le calice devient un fruit en façon de silique, molasse,
„ charnuë, & remplie d'une très-grande quantité de petites semences „ .

Le Sieur Giffart Graveur, est si bien entré dans cette idée, que lui en a donné ce R. P. & qui est tout-à-fait conforme à l'original, & il l'a dessinée avec tant de perfection & de délicatesse, qu'on la reconnoît tout-aussitôt sans pouvoir s'y méprendre, dans le Livre des Nouveaux Genres des Plantes de l'Amérique.

Juin 1730

Extrait des MEMOIRES POUR L'HISTOIRE DES SCIENCES ET DES BEAUX-ARTS. ARTICLE LVIII. *REMARQUES CRITIQUES sur les Plantes décrites dans le sixième Tome du Voyage aux Isles de l'Amérique*. Avril 1730. pp. 1065-1068.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Préambule

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une étude bibliographique valorisée sous forme d'un article publié. La revue la plus récente et complète sur l'histoire, la taxonomie et l'écologie de la vanille est le livre de Bouriquet publié en 1954, qui a été récemment complété par une révision taxonomique partielle proposée par Soto Arenas (2003).

Etant donné la fragmentation des informations concernant le vanillier, ou l'ancienneté des publications, il nous a paru intéressant de condenser nos recherches bibliographiques en un seul endroit, plus accessible pour les chercheurs et orchidophiles intéressés par la vanille. Cet article présente une mise à jour des connaissances actuelles (incluant des données récentes de génétique moléculaire) sur la taxonomie, la phylogénie, et l'histoire de la culture et de la dissémination de la vanille (genre *Vanilla* Plumier ex Miller), particulièrement *V. planifolia* G. Jackson, syn. *V. fragrans* (Salisb.) Ames. Cette revue bibliographique a été complétée par une description de la diversité et de la reproduction en conditions naturelles dans des zones d'introduction telle que l'île de La Réunion, ainsi que par un état des lieux des efforts internationaux en faveur de la préservation des ressources génétiques et des recherches internationales menées sur la génétique des vanilliers.

Cette revue bibliographique montre que la vanille est un modèle de choix pour étudier les conséquences de la domestication (à travers la reproduction végétative) mais également pour élucider l'histoire évolutive de la plus grande famille de plantes : les orchidées.

Article N°1 :

Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge

Séverine BORY - Michel GRISONI - Marie-France DUVAL - Pascale BESSE

Publié dans :

Genetic Resources and Crop Evolution, doi: 10.1007/s10722-10007-19260-10723

Mots clés : Conservation, diversité génétique, génétique moléculaire, taxonomie des orchidées, reproduction végétale, *Vanilla planifolia*

Résumé

Le genre *Vanilla* appartient à la famille des Orchidaceae et *Vanilla planifolia*, probablement endémique des forêts tropicales de l'est du Mexique, est la principale source de vanille commerciale. De nombreuses publications apportent des informations nouvelles sur la taxonomie des *Vanilla*, particulièrement grâce à la génétique moléculaire. Cependant, la taxonomie du genre est toujours imprécise et de nombreuses synonymies subsistent. D'autres études montrent que l'hybridation interspécifique et peut-être même la polyploïdisation ont joué un rôle important dans l'évolution du genre. Les connaissances sur la diversité génétique et la biologie reproductive de *V. planifolia* en conditions naturelles se sont fortement enrichies. Elles montrent qu'une diversité des systèmes de reproduction existe chez le vanillier et que ce genre pourrait être un bon modèle pour étudier le rôle de l'odeur des fleurs dans l'évolution des orchidées. De récentes études sur les conséquences génétiques de la domestication de *V. planifolia* sont aussi présentées, ce qui amène à poser des questions scientifiques majeures concernant l'origine de la diversité phénotypique dans une culture à reproduction végétative. Enfin, toutes ces études ont démontré le besoin urgent de préserver les ressources génétiques de *V. planifolia* (pools géniques primaire et secondaire, ainsi que les ressources cultivées) et les efforts de conservation actuels sont présentés.

Genet Resour Crop Evol
DOI 10.1007/s10722-007-9260-3

RESEARCH ARTICLE

Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge

Séverine Bory · Michel Grisoni · Marie-France Duval · Pascale Besse

Received: 13 October 2006 / Accepted: 21 May 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract The genus *Vanilla* belongs to the Orchidaceae family and *Vanilla planifolia*, probably endemic from tropical forests in Eastern Mexico, is the main source for commercial vanilla. There has recently been an important number of publications covering *Vanilla* taxonomy, particularly using molecular genetics, but the taxonomy of the genus is still unclear and numerous synonyms remain. Recent studies showed that inter-specific hybridization and perhaps even polyploidization played an important role in the evolution of the genus. There has also been an important increase in the knowledge of the genetic diversity and reproductive biology of *V. planifolia* in natural conditions, showing that mating system diversity exists in *Vanilla* and that this genus could be a good model to study the role of fragrance in orchid evolution. Recent studies on the genetic consequences of *V. planifolia* domestication are also presented and raise major scientific questions regarding the origin of phenotypic diversity in a vegetatively propagated crop. Finally, all these studies have demonstrated the urgent need for preservation of the genetic resources of *V. planifolia* (primary and secondary gene pools, and cultivated resources) and current conservation efforts are presented.

Keywords Conservation · Genetic diversity · Molecular genetics · Orchid taxonomy · Plant reproduction · *Vanilla planifolia*

S. Bory · M. Grisoni
Pôle de Protection des Plantes, CIRAD, UMR PVBMT Cirad – Université de la Réunion, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, La Reunion, France

S. Bory · P. Besse (✉)
Université de La Réunion, UMR PVBMT Cirad – Université de la Réunion, 15 avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag Cedex 9, La Reunion, France
e-mail: Pascale.Besse@univ-reunion.fr

M.-F. Duval
CIRAD, UPR Multiplication Végétative, Boulevard de la Lironde, TA A-75/02, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Introduction

The most comprehensive and recent review on vanilla history, taxonomy and ecology, is the book edited by Bouriquet (1954). We present here an updated bibliographical review of the current knowledge (including recent data obtained using molecular genetics) on the taxonomy, phylogeny, and the cultivation and dissemination history of vanilla (genus *Vanilla* Plumier ex Miller), particularly *V. planifolia* G. Jackson, syn. *V. fragrans* (Salisb.) Ames. The information is supplemented with a description of diversity and reproduction in natural conditions and in areas of introduction such as Reunion Island. Present worldwide efforts for the *ex situ* preservation of vanilla genetic resources are also reviewed. Some of the research perspectives that

could be considered in these different areas are presented. This review shows that *Vanilla* can be a model of choice to study the consequences of crop domestication (through vegetative propagation) but also to unravel the early evolution history of the largest plant family: the Orchidaceae.

Vanilla taxonomy and phylogeny

Vanilla within the Orchidaceae

Distribution

The Orchidaceae family is very ancient and the genus *Vanilla*, which is monophyletic, supposedly belongs to a primitive lineage (Soto Arenas 1999b; Cameron 2003). *Vanilla* species are distributed throughout all continents, except Australia, between the 27th north and south parallels. Most (52) of the species are found in tropical America, 31 species are found in south-east Asia and New Guinea, 17 in Africa, 7 in the Indian Ocean islands, and 3 in the Pacific area (Portères 1954). From morphological observations of flowers, Portères drew hypotheses for the origin of vanilla and suggested that the primary diversification centre for the genus could be Indo-Malaysian. The Indo-Malaysian stock diversified and evolved on one hand in Madagascar, Mascarhenas islands and Africa, and on the other hand in oriental Asia and occidental Pacific islands. Asian species have evolved with a migration towards the Pacific and from there, either directly towards America either (more doubtfully) indirectly towards continental Asia and Europe during the Tertiary (65.5–2.5 mya) (Portères 1954). However, other more recent historical bio-geographical studies based on phylogeny data suggest a different scenario (Cameron 1999, 2000). Even if *Vanilla* is a pantropical genus, species from South America are sister to those from Africa and Asia. Vanillinae lineage evolved prior to the breakup of Gondwana (160 mya) in South America. Then, a migration to the Old World before 100 mya occurred, explained more by series of vicariance events than by long-distance dispersal. Consequently, Orchidaceae may have evolved much earlier than is traditionally believed. We favour an American origin for the *Vanilla* genus because recent bio-geographical data are based on molecular phylogeny and consider the Orchidaceae family as a whole, and because a trans-pacific migration is unlikely (Portères 1951a).

According to Portères (1954), 18 species are aromatic but Soto Arenas (2003) recognizes 35 known or expected aromatic species which are mostly of American origin. *V. planifolia* is the main cultivated aromatic species and 95% of the world commercial vanilla originates from it. *V. planifolia* is probably endemic from eastern Mexico tropical forests and its natural habitat roughly follows a straight line between the Oaxaca state towards Guatemala and Belize (Fig. 1) (Soto Arenas 1999a). Its population density is very low, with one specimen per 2–10 km^2 in Chimalapas (Fig. 1) and one specimen per 4 km^2 in Oaxaca (Fig. 1) (Soto Arenas 1999b). Another *Vanilla* species, *V. tahitensis* J.W. Moore is also cultivated in several Pacific countries. Some other aromatic species are grown locally or harvested in the wild but have no economical importance, for example, *V. pompona* Schiede in the West Indies, *V. chamissonis* Klotzsch in Brazil, *V. odorata* C. Presl in America, *V. clavicculata* (W. Wright) Sw., *V. griffithii* Rchb. f. and *V. abundiflora* J.J.Sm. in the West Indies and in Asia (Soto Arenas 2003).

Taxonomy and phylogeny

The *Vanilla* genus belongs to the Orchidaceae family which contains more than 800 genera distributed in more than 25,000 species (Govaerts et al. 2006). Floral characters, such as anther configuration and pollinarium structure, have been used traditionally to classify the family ((Dressler and Dodson 1960), in: (Cameron 2004)) but have been hypothesized to be subjected to selective pressure (Cameron et al. 1999). Cameron et al. (1999) cite the most recent phenetic treatment of Orchidaceae to be that of Dressler (1993). This classification is the most comprehensive system at the moment and is widely accepted by botanists and growers.

Molecular phylogenetic studies have changed substantially how *Vanilla* and its allies are now treated by orchidologists. Plastid DNA was used to carry out phylogenetic studies within the Orchidaceae family (Fay and Krauss 2003; Cameron 2004). The Vanilloideae sub-family has been further studied by Cameron et al. (Cameron 1996, 2004, 2005b;

Fig. 1 Geographical localization of Mexican and Meso-American places cited in this paper

Cameron and Chase 1998, 1999; Cameron and Dickison 1998; Cameron et al. 1999). Sequence data for the *rbc*L plastid gene divided the Orchidaceae family into five major monophyletic clades: Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae and Epidendroideae. These clades correspond to the classically recognized sub-families except for the Vanilloideae, which is now considered a new sub-family (Cameron et al. 1999). Sequence data for the *psa*B gene showed the same division of the family into five monophyletic clades but failed to resolve the positions of the Cypripedioideae and the Vanilloideae sub-families (Cameron 2004). The Vanilloideae sub-family is composed of two sub-tribes: Pogonieae and Vanillineae (Cameron 1996; Cameron and Chase 1999). Other gene sequences were used to complete phylogenetic relationships in orchids: *atp*B (Cameron 2005b), *psb*B/*psb*C particularly for *Vanilla* (Cameron and Molina 2006), where eight species of *Vanilla* were analyzed; *mat*K gene and intergenic non-coding spacer *trn*L-F for Apostasioideae (Kocyan et al. 2004) and Diurideae (Kores et al. 2001), *mat*K and *rbc*L for Arethuseae (Goldman et al. 2001), where only one accession of *V. planifolia* was analyzed. All the sequences are available in GenBank. These studies place the *Vanilla* genus in the Orchidaceae family, Vanilloidae sub-family, Vanilleae tribe and Vanillinae sub-tribe (Cameron 2005b).

The *Vanilla* genus

The genus organization

The number of species given for the *Vanilla* genus varies depending on the authors: 90 (Cameron and Chase 1999), 107 (Soto Arenas 2003), 110 (Portères 1954). The International Plant Names Index is a base which lists 188 names of *Vanilla* species (The International Plant Names Index 2004). In the list of the world's orchids compiled by Govaerts (2006) from different authors' reviews, 110 species names are accepted while 71 are not. The main goal of this list was to provide baseline on accepted data in orchid families rather than revise families. Acceptance of a species name or an infra-specific taxon is based not only on literature and common usage but also, when possible, on specialist advice and on herbarium or living collections. Soto Arenas (1999b, 2006b) cites six additional species, which do not appear in the three previous lists. All *Vanilla* species cited in the literature are compiled in Table 1.

Rolfe in 1896 first proposed a taxonomic classification for *Vanilla* species with two sections: Foliosae, where vines have developed leaves and Aphyllae, where plants have bract-like leaves (Portères 1954). Portères (1954) further divided the Foliosae section into three sub-sections: Papilloseae

Table 1 List of *Vanilla* species found in the literature

Genus	Species	Author	Source		
Vanilla	*abundiflora*	J. J. Sm.	a	b1	d
Vanilla	*acuminata*	Rolfe	a	b1	d
Vanilla	*acuta*	Rolfe	a	b1	d
Vanilla	*acutifolia*	Lodd. Cat. ex W. Baxt.			d
Vanilla	*africana*	Lindl.	a	b1	d
Vanilla	*africana* subsp. *cucullata*	(Kraenzl. ex J. Braun et K. Schum.) Szlach. et Olszewski		b2	d
Vanilla	*africana* subsp. *ramosa*	(Rolfe) Szlach. et Olszewski		b2	d
Vanilla	*albida*	Blume	a	b1	d
Vanilla	*anaromatica*	Griseb.		b2	d
Vanilla	*andamanica*	Rolfe	a	b1	d
Vanilla	*angustifolia*	Willd.		b2	d
Vanilla	*angustipetala*	Schltr.	a	b1	d
Vanilla	*annamica*	Gagnep.	a	b1	d
Vanilla	*anomala*	Ames et L.O.Williams	a	b2	d
Vanilla	*aphylla*	Blume	a	b1	d
Vanilla	*aphylla*	Eggers			d
Vanilla	*aphylla*	Wight			d
Vanilla	*appendiculata*	Rolfe	a	b1	d
Vanilla	*argentina*	Hicken	a	b2	d
Vanilla	*aromatica*	Willd.		b2	d
Vanilla	*aromatica*	Sw.		b2	d
Vanilla	*articulata*	Northr.		b2	d
Vanilla	*axillaris*	Mill.		b2	d
Vanilla	*bahiana*	Hoehne		b1	d
Vanilla	*bakeri*	Schltr.	a	b1	d
Vanilla	*bampsiana*	Geerinck		b1	d
Vanilla	*barbellata*	Rchb. f.	a	b1	d
Vanilla	*barrereana*	Y.Veyret et Szlach.		b1	d
Vanilla	*beauchenei*	A.Chevalier		b2	d
Vanilla	*bertoniensis*	Bertoni	a	b1	d
Vanilla	*bicolor*	Lindl.	a	b1	d
Vanilla	*borneensis*	Rolfe	a	b1	d
Vanilla	*bradei*	Schltr. ex Mansf.	a	b1	d
Vanilla	*calopogon*	Rchb. f.	a	b1	d
Vanilla	*calyculata*	Schltr.	a	b1	d
Vanilla	*carinata*	Rolfe	a	b1	d
Vanilla	*chalottii*	A. Finet	a	b1	d
Vanilla	*chamissonis*	Klotzsch	a	b1	d
Vanilla	*chamissonis* var. *brevifolia*	Cogn.		b2	d
Vanilla	*claviculata*	Lindl.		b2	d
Vanilla	*claviculata*	Sw.	a	b1	d
Vanilla	*columbiana*	Rolfe	a	b1	d
Vanilla	*correllii*	R. P.Sauleda et R. M. Adams		b1	d
Vanilla	*coursii*	H. Perrier	a	b1	d
Vanilla	*crenulata*	Rolfe	a	b2	d

Table 1 continued

Genus	Species	Author	Source			
Vanilla	*cribbiana*	Soto Arenas			c1	
Vanilla	*cristagalli*	Hoehne		b1		d
Vanilla	*cristatocallosa*	Hoehne		b1		d
Vanilla	*cucullata*	Kraenzl. ex J. Braun et K. Schum.	a	b1		d
Vanilla	*decaryana*	H. Perrier	a	b1		d
Vanilla	*denticulata*	G. F. J. Pabst		b1		d
Vanilla	*diabolica*	P. O'Byrne		b1		d
Vanilla	*dietschiana*	Edwall	a	b2		d
Vanilla	*dilloniana*	Correll	a	b1		d
Vanilla	*domestica*	(L.) Druce		b2		d
Vanilla	*dominiana*	Hort. ex Gentil				d
Vanilla	*dressleri*	Byrd			c2	
Vanilla	*dubia*	Hoehne		b1		d
Vanilla	*duckei*	Huber	a	b2		d
Vanilla	*dungsii*	Pabst		b1		d
Vanilla	*edwallii*	Hoehne		b1		d
Vanilla	*eggersii*	Rolfe	a	b2		d
Vanilla	*ensifolia*	Rolfe	a	b2		d
Vanilla	*epidendrum*	Mirb.		b2		d
Vanilla	*fasciola*	(G. Forst.) Spreng.		b2		d
Vanilla	*fimbriata*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*fragrans*	(Salisb.) Ames	a	b2		d
Vanilla	*françoisii*	H. Perrier	a	b1		d
Vanilla	*gardneri*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*giulianettii*	F.M.Bailey	a	b1		d
Vanilla	*grandiflora*	Lindl.		b1		d
Vanilla	*grandifolia*	Lindl.	a	b1		d
Vanilla	*grandifolia* var. *lujae*	(De Wild.) Geerinck		b2		d
Vanilla	*gratiosa*	Griseb.		b2		d
Vanilla	*griffithii*	Rchb. f.	a	b1		d
Vanilla	*griffithii* var. *formosana*	T. Itô		b2		
Vanilla	*griffithi*i var. *ronoensis*	(Hayata) S. S. Ying		b2		d
Vanilla	*guianensis*	Splitg.		b2		d
Vanilla	*hallei*	Szlach. et Olszewski		b1		d
Vanilla	*hamata*	Klotzsch	a	b1		d
Vanilla	*hameri*	Soto Arenas			c1	
Vanilla	*hartii*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*havilandii*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*helleri*	A.D.Hawkes		b1		d
Vanilla	*heterolopha*	Summerh.	a	b1		d
Vanilla	*hirsuta*	M. A. Clem. et D. L. Jones		b2		d
Vanilla	*hostmanni*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*humblotii*	Rchb. f.	a	b1		d
Vanilla	*imperialis*	Kraenzl.	a	b1		d
Vanilla	*imperialis* var. *congolensis*	De Wild.		b2		

Table 1 continued

Genus	Species	Author	Source			
Vanilla	*inodora*	Schiede	a	b1		d
Vanilla	*insignis*	Ames	a	b1		d
Vanilla	*kaniensis*	Schltr.	a	b1		d
Vanilla	*kempteriana*	Schltr.	a	b1		d
Vanilla	*kinabaluensis*	Carr	a	b1		d
Vanilla	*klabatensis*	Schltr.	a			
Vanilla	*latisegmenta*	Ames et C. Schweinf.	a	b1		d
Vanilla	*laurentiana*	De Wild.		b2		d
Vanilla	*laurentiana* var. *gilletii*	De Wild.		b2		
Vanilla	*leprieurii*	R. Porteres	a	b1		d
Vanilla	*lindmaniana*	Kraenzl.	a	b1		d
Vanilla	*lujae*	De Wild.	a	b2		d
Vanilla	*lutea*	C. Wright ex Griseb.		b2		d
Vanilla	*lutescens*	Moq. ex Dupuis		b2		d
Vanilla	*madagascariensis*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*majaijensis*	Blanco		b2		d
Vanilla	*marowynensis*	Pulle	a	b1		d
Vanilla	*martinezii*	?			c2	
Vanilla	*methonica*	Rchb. f. et Warszc.	a	b1		d
Vanilla	*mexicana*	Mill.		b1		d
Vanilla	*microcarpa*	H. Karst.		b2		d
Vanilla	*montagnacii*	R. Porteres	a			d
Vanilla	*montana*	Ridl.	a	b2		d
Vanilla	*moonii*	Thwaites	a	b1		d
Vanilla	*nigerica*	Rendle	a	b1		d
Vanilla	*ochyrae*	Szlach. et Olszewski		b1		d
Vanilla	*odorata*	C. Presl	a	b1		d
Vanilla	*organensis*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*oroana*	Dodson		b2		d
Vanilla	*ovalifolia*	Rolfe		b2		d
Vanilla	*ovalis*	Blanco	a	b1		d
Vanilla	*ovata*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*palembanica*	Teysm. et Binn.	a	b1		d
Vanilla	*palmarum*	(Salzm. ex Lindl.) Lindl.	a	b1		d
Vanilla	*palmarum* var. *grandifolia*	Cogn.		b2		d
Vanilla	*parishii*	Rchb. f.	a	b2		d
Vanilla	*parvifolia*	Barb. Rodr.	a	b1		d
Vanilla	*pauciflora*	Dressler		b2		d
Vanilla	*penicillata*	Garay et Dunst.		b1		d
Vanilla	*perexilis*	Bertoni	a	b1		d
Vanilla	*perplexa*	Soto Arenas			c1	
Vanilla	*perrieri*	Schltr.	a	b1		d
Vanilla	*pfaviana*	Rchb. f.	a	b2		d
Vanilla	*phaeantha*	Rchb. f.	a	b1		d
Vanilla	*phalaenopsis*	Reichb. f. ex Van Houtte	a	b1		d

Table 1 continued

Genus	Species	Author	Source			
Vanilla	*philippinensis*	Rolfe		b2		d
Vanilla	*pierrei*	Gagnep.	a	b1		d
Vanilla	*pilifera*	R. E. Holttum	a	b1		d
Vanilla	*pittierii*	Schltr.	a	b2		d
Vanilla	*planifolia*	Jacks. ex Andrews		b1		d
Vanilla	*planifolia*	Griseb.				d
Vanilla	*planifolia* var. *gigantea*	Hoehne		b2		d
Vanilla	*planifolia* var. *macrantha*	M. Gomez		b2		d
Vanilla	*planifolia* var. *macrantha*	Griseb.				d
Vanilla	*platinilla*	Hort. ex Gentil				d
Vanilla	*platyphylla*	Schltr.	a	b1		d
Vanilla	*pleei*	Porteres	a	b2		d
Vanilla	*poitaei*	Rchb. f.	a	b1		d
Vanilla	*polylepis*	Summerh.	a	b1		d
Vanilla	*pompona*	Schiede	a	b1		d
Vanilla	*ponapensis*	Kanchira et Yamamoto	a	b2		d
Vanilla	*porteresiana*	Szlach. et Y. Veyret		b1		d
Vanilla	*preussii*	Kraenzl.	a	b2		d
Vanilla	*pseudopompona*	Soto Arenas			c1	
Vanilla	*pterosperma*	Lindl. ex Wall.		b2		d
Vanilla	*purusara*	Barb. Rodr. ex Hoehne		b1		d
Vanilla	*ramificans*	J. J. Sm.	a			
Vanilla	*ramosa*	J. J. Sm.		b2		d
Vanilla	*ramosa*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*ribeiroi*	Hoehne	a	b1		d
Vanilla	*rojasiana*	Hoehne		b1		d
Vanilla	*ronoensis*	Hayata	a	b2		d
Vanilla	*roscheri*	Rchb. f.	a	b1		d
Vanilla	*rubiginosa*	Griff.		b2		d
Vanilla	*rubra*	(Lam.) Urb.		b2		d
Vanilla	*ruiziana*	Klotzsch	a	b1		d
Vanilla	*sativa*	Schiede		b2		d
Vanilla	*savannarum*	Britton		b2		d
Vanilla	*schliebenii*	Mansf. ex Schlieben		b2		d
Vanilla	*schwackeana*	Hoehne		b1		d
Vanilla	*seranica*	J. J. Sm.	a	b1		d
Vanilla	*seretii*	De Wild.	a	b1		d
Vanilla	*siamensis*	Rolfe ex Downie	a	b1		d
Vanilla	*somai*	Hayata	a	b2		d
Vanilla	*speciosa*	Bovall ex Naves				d
Vanilla	*sprucei*	Rolfe	a	b1		d
Vanilla	*sumatrana*	J. J. Sm.	a	b1		d
Vanilla	*surinamensis*	Rchb. f.		b1		d
Vanilla	*sylvestris*	Schiede		b2		d
Vanilla	*tahitensis*	J. W. Moore	a	b2		d

Table 1 continued

Genus	Species	Author	Source		
Vanilla	*taiwaniana*	S. S. Ying		b2	d
Vanilla	*tiarei*	Costantin et Bois		b2	d
Vanilla	*tisserantii*	R. Porteres	a	b2	d
Vanilla	*tolypephora*	Ridl.		b2	d
Vanilla	*trigonocarpa*	Hoehne		b1	d
Vanilla	*uncinata*	Huber ex Hoehne		b1	d
Vanilla	*utteridgei*	J. J. Wood		b1	d
Vanilla	*vanilla*	(L.) H. Karst.			d
Vanilla	*vanilla*	Huth		b2	d
Vanilla	*vellozii*	Rolfe	a	b2	d
Vanilla	*verrucosa*	Hauman	a	b1	d
Vanilla	*viridiflora*	Blume		b2	d
Vanilla	*walkeriae*	Wight	a	b1	d
Vanilla	*wariensis*	Schltr.	a	b1	d
Vanilla	*weberbaueriana*	Kraenzl.	a	b1	d
Vanilla	*wightiana*	Lindl.	a		
Vanilla	*wightii*	Lindl. ex Wight		b1	d
Vanilla	*wrightii*	Rchb. f.	a	b2	d
Vanilla	*yersiniana*	Guillaumin et Sigaldi		b2	d
Vanilla	*zanzibarica*	Rolfe	a	b2	d

a: species cited by Portères (1954); b1: accepted names of species published in the World Checklist of Orchidaceae of Royal Botanic Gardens, Kew (Govaerts et al. 2006); b2: not accepted names of species published in the World Checklist of Orchidaceae of Royal Botanic Gardens, Kew (Govaerts et al. 2006); c1: species cited by Soto Arenas (1999b); c2: species cited by Soto Arenas (2006b); d: species published on the Internet in The International Plant Names Index (2004)

have thick leaves and labellum with more or less fleshy hairs, Lamellosae have also thick leaves but labellum wear scaly lamellae and Membranaceae have thin membraneous to sub-membraneous leaves. Soto Arenas (2003) invalidated this classification by stressing that sub-sections are heterogeneous and incomplete. However, as no revision of the taxonomy has been proposed to date, Portères' classification is still used.

Phylogenetic relationships among Vanilla species

Vegetative anatomical characters have been used to generate a cladistic analysis of 14 *Vanilla* species (Stern and Judd 1999). Although results were partially in agreement with Portères' classification, the sampling was too small to conclude further.

Nuclear sequence data for the Internal Transcribed Spacer (ITS) of the 18S and 26S rRNA genes, were used to unravel relationships within sub-tribes and genera in the Orchidaceae (Cameron 2004). In order to establish phylogenetic relationships between Mexican *Vanilla* species, Soto Arenas (1999b) studied the same sequences. The ten species of Mexican vanilla included in the study belonged to a monophyletic group, divided into three clades, which is in agreement with Portères classification. The most external clade contained *V. inodora* Schiede of the Foliosae section and Membranaceae sub-section. The second clade contained *V. barbellata* Rchb. f. of the Aphyllae section, and the third clade contained the eight remaining species, which are aromatic and belong to the Foliosae section and Lamellosae sub-section. In the third clade, two groups could be distinguished based on morphology. The group containing *V. pompona* included *V. cribbiana* Soto Arenas and *V. hameri* Soto Arenas, and shared characteristic trigonal fruits and large, fragrant yellow flowers without papilla. The group containing

V. planifolia included *V. insignis* Ames, *V. odorata* and *V. phaeantha* Rchb.f., which were characterized by less trigonal, smaller fruits and greenish flowers. At the intra-specific level, the ITS data showed little variation, which might reflect methodological (alignment or sequencing) artefacts rather than a genuine variation.

Analysis of the plastid gene *rbc*L sequences of 21 *Vanilla* species had showed congruent results with sequences from the other analyzed gene regions (ITS, *mat*K) as well as with morphology (Soto Arenas 2003), with the presence of an external clade that includes species of the Foliosae section and Membranaceae sub-section such as *V. inodora*, *V. mexicana* Mill., *V. angustipetala* Schltr. and *V. martinezii*, which are confined to the Neotropics. The remaining species are separated in two main clades, one including the Old World and Caribbean species and the other the American fragrant species (Soto Arenas 2003).

The origin of V. tahitensis

Vanilla tahitensis is the second most cultivated aromatic vanilla species worldwide. Historically, it was introduced into Tahiti from the Philippines by Amiral Hamelin in 1848 (Correll 1953; Portères 1954). However, the genetic identity of this species is unclear. Portères (1954) cites various authors giving each a different name: *V. ovalis* Blanco (1845) = *V. planifolia* Andrews (by Naves in 1879) = *V. majaijensis* Blanco (by Rolfe in 1896) = *V. aromatica* S.W. (by Naves in 1879) and *V. ovalis* Blanco = *V. philippinensis* Rolfe (1896).

Some authors even suggested that *V. tahitensis* results from inter-specific hybridization between *V. planifolia* and a second parent, either a specimen of a *V. pompona*–*V. odorata* complex (Portères 1951b; Soto Arenas 1999b) or *V. pompona* (Portères 1954). This was based upon morphological traits shared either with *V. planifolia* (leaf, inflorescence and flower morphologies and the general aspect of the fruit (Portères 1954)), with *V. pompona* (the reflection of the labellum disc, the presence of heliotrope (piperonal) and a low vanillin content in the pods, and indehiscence of the mature pod), or with *V. odorata* (the stem anatomy (P. Roux, in: (Portères 1951b)) and the fruit anatomy (R. Simony, in: (Portères 1953)), the capacity to flower less seasonally and in equatorial areas such as New Guinea (Soto Arenas 1999b)). Moreover, the leaf dimensions of *V. tahitensis* are exactly intermediate between that of *V. planifolia* and *V. odorata* (Soto Arenas 2006b).

Molecular markers were used to elucidate *V. tahitensis* origin. In a first Random Amplified Polymorphic DNA study (RAPD), 93% of all detected markers for *V. tahitensis* were shared with *V. planifolia* and none of the *V. pompona* specific fragments was shared with *V. tahitensis*. The authors favoured the hypothesis of a close relation between *V. tahitensis* and *V. planifolia* (Besse et al. 2004). In another study carried out with RAPD markers, Schlüter did not find good evidence in support of an hybrid origin of *V. tahitensis* (all combination between three putative parents *V. planifolia*, *V. odorata*, and even *V. insignis* were tested) (Schlüter 2002).

In two other studies, the Amplified Fragment Length Polymorphism technique (AFLP) confirmed that *V. planifolia* and *V. tahitensis* are genetically very closely related. The genetic distance calculated between *V. tahitensis* and *V. pompona* was approximately three times greater than between *V. tahitensis* and *V. planifolia*. In addition, very few bands present in both *V. tahitensis* and *V. pompona* were found (Bory 2004; Duval et al. 2006).

So far, the molecular results did not validate the suggested inter-specific hybrid origin of *V. tahitensis* and favoured the hypothesis of a variation of *V. planifolia*. Nevertheless the use of co-dominant markers is needed for confirmation, such as nuclear Simple Sequence Repeats (SSR). These were developed in orchids (Gustafsson 2000; Soliva et al. 2000; Fay and Krauss 2003) as well as recently for *V. planifolia* (Bory et al., unpublished data).

The taxonomy of the *Vanilla* genus continues to be puzzled. Remaining questions on taxonomy and phylogeny are numerous, such as the positions of the Cypripedioideae and the Vanilloideae sub-families in the Orchidaceae family, the position of *Vanilla* and the sister group within Vanilloideae, the number of *Vanilla* species and the numerous synonymy and the phylogeny and taxonomical position of *V. tahitensis*. Sequence data for the plastid and nuclear gene introns, as performed by Cameron et al. (Cameron et al. 1999; Cameron 2004; Cameron and Molina 2006) and Soto Arenas (1999b), will be very useful to revise the taxonomy of the *Vanilla* genus.

Reproductive biology

The reproduction of American vanilla in natural conditions

Sexual reproduction is rarely observed in natural conditions. Natural reproduction of *V. planifolia* in Puerto Rico was observed for less than 1% of the flowers (Childers and Cibes 1948). Weiss (2002) reported similar rates (between 1 and 3%) in Central America. Soto Arenas (1999b) reported an even lower rate in Mexico (1 fruit for 100–1,000 flowers).

The floral structure of vanilla makes natural self-pollination difficult. The rostellum prevents contact between stamen and stigmata except for some rare species like *V. palmarum* and *V. inodora*, which are self-pollinating (Soto Arenas 2006b). Nevertheless, spontaneous self-pollination rates of 6.06% are reported for *V. chamissonis*, in the São Paulo area (Brazil) (Macedo Reis 2000). Likewise, some *V. planifolia* cultivars in Mexico show natural self-pollination rates from 4–6% to 20% (Soto Arenas 1999b). Similarly, in 1997, Hernandez-Apolinar conducted experiments on reproduction costs associated with cultivated *V. planifolia* and found that 6% of the wild individuals used to establish crops in Oaxaca by the end of the 1980's were self-pollinating (Lubinsky 2004).

The floral morphology of vanilla favours out-crossing. In *V. chamissonis*, 15.16% of natural allogamy is reported (Macedo Reis 2000). Similarly, in Mexico, most *V. planifolia* varieties, like 'Mansa', are unable to naturally self-pollinate (Soto Arenas 1999b). Some self-incompatible *V. planifolia* varieties are even reported, like 'Oreja de Burro', for which 80–100% of fruit aborts three months after self-pollination (Castillo Martinez and Engleman 1993). Dequaire (1976) observed that successive self-fertilization of *V. planifolia* led to inbreeding depression with plants being less vigorous and more sensitive to diseases. All these observations are in favour of an out-crossing reproductive mode for *V. planifolia*. Surprisingly, Soto Arenas (1999b) found very low allogamy rates (using isozyme markers) in the Veracruz (0.106) and Oaxaca regions (0.082), and very low observed heterozygosity. He suggested that the dominant sexual reproductive mode in these regions was autogamy, and this was explained by the possible occurrence of a majority of self-compatible individuals in these regions (Soto Arenas 1999b). The higher allogamy rate observed in Veracruz was supposedly due to the presence of the self-incompatible 'Oreja de Burro' type (Soto Arenas 1999b). It was concluded that *V. planifolia* possesses a mixed reproductive system in which the real proportion of self-compatible and self-incompatible individuals is still unknown (Soto Arenas 1999b). It seems as well essential to assess the relative success rates of self-pollination versus allo-pollination in *V. planifolia*.

In America, pollinators are not well known. According to some authors (Lecomte 1901; Ridley 1912; Bouriquet 1954; Purseglove et al. 1981; Torregrossa 1988) pollinators are rare and only exist in South and Central America. According to these authors, *V. planifolia* is pollinated by social bees of the *Melipona* genus and by hummingbirds. Other pollinators have been reported, like bees of the genus *Trigona* suspected to carry out pollination in Guadeloupe (Stehlé 1952). Soto Arenas (1999b) reported the existence of three pollination systems among Mexican vanilla species. The first system, restricted to *V. inodora*, involves carpenter bees of the *Xylocopa* genus. The second system, specific to *V. pompona*, *V. hameri* and *V. cribbiana*, involves bees from the *Euglossa* genus, in which males collect flower nectar. The third system concerns *V. planifolia*, *V. odorata* and *V. insignis* and is a deceptive pollination system, where flowers do not reward the insects and are visited equally by males and females. The latter is commonly observed in orchids with low population densities (Ackerman 1986). According to Soto Arenas (2006b), *Euglossa viridisima* and maybe *Eulaema* spp. are the real pollinators of *V. planifolia*. Lubinsky *et al.* (2006) have carried out field observations in Oaxaca of *V. planifolia* for 2 weeks of the spring of 2004. They have noted occasional visit of flowers by ants, *Melipona*, *Euglossa*, *Exeretes* and hummingbirds without occurrence of pollination event. They have observed on *V. grandiflora* Lindl., in the Peruvian Amazon in September 2005, visit of flowers by *Melipona* and *Euglossa* without pollen removal due to their too small size, but pollination by *Eulaema meriana* Olivier is suspected following observation of successful pollen removal by this orchid bee species (Lubinsky et al. 2006).

Like for other orchids, it was suggested that *V. planifolia* seeds could be dispersed by air or water (Arditti and Ghani 2000). Soto Arenas (1999b, 2003) suggested that aromatic *Vanilla* fruits (a character almost exclusively restricted to American species) are an adaptation to bat dispersal. It was even proposed that *V. planifolia* seeds could be endo-ornithochors with bird digestive fluids helping germination (Bouriquet 1954; Arditti and Ghani 2000). Recently in *V. grandiflora*, fragrance collection by orchid bees from fruits was also observed (Lubinsky et al. 2006) which may lead to dispersion of sticky seeds. This raises important questions regarding the early evolution history of the orchid family which might have involved a transition away from animal-mediated dispersal (Lubinsky et al. 2006).

Seeds produced by vanilla rarely germinate. They have an undifferentiated embryo, little reserve matter, very hard and waxy teguments containing germination inhibitors (Kleinert, 1963, in: (Dequaire 1976)). Childers et al. (1959) noted that a small number of seeds could germinate in ideal conditions of humidity, temperature, and nutrition. At the Federal Experiment Station of Mayaguez in Puerto Rico, they observed seeds germinating and growing on moist, rotten wood support. The dependence of orchid seeds on mycorrhizal fungi for germination is commonly admitted (Arditti and Ghani 2000). This might therefore be the case for *Vanilla*, although, to our knowledge, this has never been demonstrated.

Vegetative propagation ultimately remains the predominant reproduction mode in *Vanilla*. It naturally occurs from stem cuttings (Bouriquet 1954). In natural conditions, one individual of *V. planifolia* can cover very large areas, up to 0.2 ha, although not very densely (Soto Arenas 1999b). The predominance of vegetative propagation as strategy to the development of the settlements of *V. chamissonis* is reported (Macedo Reis 2000). For this reason, vanilla crops can be easily established from stem cuttings of 8–12 nodes, collected from healthy and vigorous vines (Stehlé 1952; Purseglove et al. 1981; Soto Arenas 2003).

Inter-specific hybridization

Vanilla is notable for providing one of the few cases in which natural hybridization in Neotropical orchids has been reported (Lubinsky et al. 2006). Nielsen et al. (Nielsen and Siegismund 1999; Nielsen 2000) evidenced some spontaneous wild hybrids between the Aphyllae species *V. claviculata* and *V. barbellata* in the Puerto Rico region using morphological and iso-enzymatic markers. However, inter-specific differentiation was found to be low between both species and was mainly due to differences in allelic frequencies rather than the presence of specific alleles. It was then suggested that these species are closely related with a relatively recent common ancestor (Nielsen and Siegismund 1999; Nielsen 2000).

Inter-specific hybridization between American species of the Foliosae section (Lamellosae subsection) was used successfully in the breeding programme conducted in Madagascar where *V. planifolia* X *V. tahitensis* and *V. planifolia* X *V. pompona* hybrids were obtained (Delassus 1960; Dequaire 1976; FOFIFA 1990). It is thus highly probable that spontaneous hybrids between *V. planifolia* and other sympatric species could occur, as suggested between *V. planifolia* and *V. pompona* or *V. insignis*, sympatric near Papantla (Lubinsky 2004).

Soto Arenas (1999b) suggested that fragrant species such as *V. barbellata* (American species of the Aphyllae section) and *V. inodora* (American species of the Foliosae section Membranaceae subsection) are too divergent from *V. planifolia* to expect successful hybridization with it. However, recently, breeding programs in India successfully created hybrids between the distantly related *V. planifolia* and *V. aphylla* (American species of the Foliosae section and Asiatic species of the Aphyllae section, respectively) (Minoo et al. 2006b), demonstrating the absence of reproductive barriers between distantly related *Vanilla* species.

The occurrence of inter-specific hybridization is an issue that must be considered and tested in taxonomic and phylogenetic studies of the genus. It could be one of the reasons for the difficulties in clearly delimiting and identifying species and for the present confusion in *Vanilla* taxonomy.

V. planifolia in its area of origin

The history of *V. planifolia* in Mexico

The pre-Columbian history of vanilla in Mexico is poorly documented. Stehlé (1952) refers to archive documents dating from 1427, which mention the gathering of vanilla pods by Aztecs. Vanilla belongs

to a group of native plants in the Maya Lowlands that could have been subjected to human selection before 3400 B.C. However, its domestication origin is still unresolved (Colunga-GarciaMarin and Zizumbo-Villareal 2004). The pods were used for medicinal purposes, as mentioned in a 1552 Aztec herbal, as well as to flavour the hot chocolate drinks valued among the Aztec nobles (Bruman 1948). The first vanilla plantations were only established from 1767 by the Totonac Indians (in the Veracruz region), particularly in the Papantla and Misantla areas (Fig. 1), marking the start of vanilla cultivation. According to Ecott (2004), Soto Arenas considers that Totonac Indians did not use manual pollination to produce vanilla pods. Indeed, no evidence of manual pollination has been reported before the 19th century. From 1841, the technique of manual pollination discovered in Europe was transferred to Mexico and Totonac Indians became the world most important producers (Bruman 1948), until the supremacy of Madagascar in 1924 (Lucas 1990).

Vanilla diversity in Mexico

Today, *V. planifolia* is cultivated in Mexico mainly in two areas: northern Veracruz and northern Oaxaca (Fig. 1). Crops in Oaxaca were established by the end of the 1980's from regional spontaneous specimens. In Veracruz, cultivated populations were established two centuries ago and their origin is unknown. They are less variable and very different from the cultivated populations of Oaxaca (Soto Arenas 1999a).

Four major morphological types of *V. planifolia* are grown in Mexico (Soto Arenas 2003). The four types differ in their vegetative appearance. The type 'Mansa' (or 'Dura' (Soto Arenas 2003) or 'Fina' (Castillo Martinez and Engleman 1993)) is the most widespread. Diaz (1989) refers to two sub-types among 'Mansa' which can be distinguished based on stem and leaf colour ('Amarilla' and 'Verde'). The 'Acamaya' type, also named 'Rayada' or 'Variegata' shows yellow stripes on leaves and stems. The 'Albo-marginata' type has leaves with a white margin and does not exist in the wild. The 'Oreja de Burro' type is distinguished from 'Mansa' by its reproduction mode. 'Oreja de Burro' is self-incompatible while 'Mansa' is self-compatible (Castillo Martinez and Engleman 1993; Soto Arenas 2003). According to Castillo Martinez and Engleman (1993), who have carried out a morphological study on these types from July 1987 to January 1989 in the Papantla area, morphological differences are found. 'Oreja de Burro' vines are more ramified than 'Mansa' plants, with longer internodes, larger leaf area with a slight striation on the upper face, and higher growth rate (Castillo Martinez and Engleman 1993). Soto Arenas (2003) does not confirm these morphological variations but distinguishes the two types with other characteristics. The 'Oreja de Burro' type has a better growth and a better resistance to fungi infection than 'Mansa' (Soto Arenas 2003). The existence of 'Oreja de Burro' is a problem in Mexico because its use has strongly hindered vanilla production (Soto Arenas 2003). Lopez ((1900), in: (Diaz 1989)) cites another type, 'Mestiza' which has larger leaves and fruits than 'Mansa', but Castillo Martinez and Engleman (1993) quote 'Mestiza' as the ancient name for 'Oreja de Burro'. There is no evidence to suggest whether 'Mansa', 'Acamaya', 'Albo-marginata', and 'Oreja de Burro' represent different clones of the same species or are hybrids between *V. planifolia* and closely related species (Lubinsky 2003).

The first molecular data on specimens from crops in northern Veracruz, Oaxaca and other Mexican regions were obtained using iso-enzymes and showed low levels of total genetic variation. However, the data showed an important differentiation between plants from the two main regions, with on one hand a homozygote excess in Veracruz and on the other hand a higher genotypic diversity with some heterozygote individuals in Oaxaca (Soto Arenas 1999b). These results were recently confirmed by another iso-enzymatic study performed to characterize the cultivated and spontaneous vanilla in the south-eastern region of Mexico, with the highest heterozygosity and polymorphism levels found in natural populations from northern Oaxaca. Unique genotypes were found in wild accessions in Tabasco, Chiapas and Guatemala ((Cibrian Jaramillo 1999), in: (Lubinsky 2003)).

A molecular analysis using RAPD markers allowed a further genetic characterization of *V. planifolia* in Meso-America. Using these markers, Schlüter (2002) was able to differentiate *V. planifolia* from Costa Rica and Mexico. Among Mexican *V. planifolia*, two main groups were revealed: individuals from Oaxaca, Chiapas and Quintana Roo on one hand, and individuals from Veracruz, Federal District

of Mexico, San Luis Potosi, Tabasco and Oaxaca on the other hand (Fig. 1). The individuals from Oaxaca and Tabasco present in the second group most probably correspond to specimens that were collected from the Veracruz region at the time of the establishment of new crops. As shown in the isozyme study, the specimens from Oaxaca were found more diverse than those from Veracruz.

Attempts to study some hypervariable regions, such as introns in three protein coding genes (alcohol dehydrogenase, calmoduline and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) in order to detect intra-specific sequence variations were unsuccessful due to lack in polymorphism (Soto Arenas 1999b).

V. planifolia in introduction areas

V. planifolia dissemination from its area of origin

Following the discovery of the New World by C. Colombus in 1492, the earliest vanilla dissemination record from Mexico is the one by Father Labat who imported three *V. planifolia* vines into Martinique in 1697 (Lecomte 1901); and from there to Guadeloupe in 1701 (Table 2). There is then an early record of an introduction in Reunion Island in 1793 (Ridley 1912) (Table 2). Early in the 19th century, one major event is *V. planifolia* introduction by Marquis of Blandford into the collection of C. Greville at Paddington where it flowered in 1807. Greville then supposedly sent some cuttings to the botanical gardens of Antwerp (Belgium) and from there to Paris (Correll 1953; Bouriquet 1954). From the Botanical Garden of Antwerp, it was introduced into Buitenzorg in Java in 1819 by Marchal (Lecomte 1901; Bouriquet 1954; Purseglove et al. 1981), and in Reunion Island from the Jardin du Roi in Paris in 1822 by the ordinance officer of Bourbon, Marchant (Lecomte 1901, Bouriquet 1954) (Table 2). Another early introduction event is documented in India in 1835 (Table 2) but the plant died after flowering (Correll 1953).

The lack of natural pollinators in the areas of introduction prevented sexual reproduction and pod production until the first half of the 19th century. Artificial pollination was discovered twice, independently and a few years apart, by C. Morren in 1836 in Liège and by J. Neumann in 1838 in Paris. However in all *V. planifolia* cultivating countries, pollination is made according to an easy manual technique discovered in 1841 by Edmond Albius in Reunion Island (Lecomte 1901; Childers and Cibes 1948). From 1841, when this simple manual pollination technique for vanilla was shared out among vanilla growers, vanilla vines were rapidly spread to the whole Indian Ocean area (Mauritius, Seychelles, Madagascar, Comoros) and to the rest of the world (Africa, Asia, Oceania, West Indies) during the 19th century (Table 2).

V. planifolia diversity in introduction areas

It is commonly agreed that *V. planifolia* cultivation started from a very narrow genetic pool (Soto Arenas 1999b; Lubinsky 2003), and that the extensive vegetative reproduction that followed might be responsible for the relatively high genetic uniformity observed to date in vanilla crops. Soto Arenas even suggested that most *V. planifolia* cultivated specimens around the world came from a unique clone (of the 'Mansa' type) exported from Mexico (Ecott 2004) to the C. Greville collection at Paddington and disseminated by cuttings via the botanical gardens of Paris and Antwerp, from where it would have been disseminated worldwide (Correll 1953; Bouriquet 1954). However, in many areas of introduction, some phenotypic variation is described. This will be discussed based on the case of Reunion Island as it was recently extensively studied, but this could be applied to other introduction areas.

Phenotypic diversity in Reunion Island

In Reunion Island, growers distinguish two main morphological types of *V. planifolia*. The major type named 'Classique' has a light green colour, flat leaves and pods progressively narrow. The second main type named 'Mexique' or 'Bleue' has darker and more bluish leaves than 'Classique', with a central gutter and curved sides and pods are cylindrical up to the stem. There are also other minor variants recognized by growers: the 'Aiguille' type which is distinguishable from the 'Classique' type by its more slender leaves and a thin pod; the 'Grosse Vanille' type which resembles *V. pompona*, with bigger and thicker leaves and stem than 'Classique'; the 'Stérile' type with the same morphological characteristics than

Table 2 Historical records of vanilla dissemination around the world

Introduction date	Cultivation date record	Localization	From	By	Ref.
West Indies					
1697		Martinique		Father Labat	(6)
1701		Guadeloupe	Martinique	Father Labat	(2, 6)
1900's		St Vincent	Seychelles		(5)
<1900		Puerto Rico	Mexico	Parent of MM Utuano	(2)
1909		Puerto Rico	United States Plant Introduction Garden of Florida	Federal Experiment Station of Puerto Rico	(2, 5)
	1898	French Guyana			(10)
Not specified		Surinam			(10)
	1896	Trinidad			(10)
	1910's	Jamaica			(10)
Indian Ocean					
1793		Reunion Island			(10)
1819		Reunion Island	Cayenne	Philibert & Perrotet	(2, 6)
1820		Reunion Island	Philippines	Philibert & Perrotet	(2, 6)
1822		Reunion Island	Jardin du Roi in Paris	Marchant	(2, 6)
1875		Reunion Island	Martinique		(6)
1827		Mauritius			(5)
1836		Mauritius			(6)
1880		Mauritius			(2, 4)
	1865	Mauritius			(6)
1866		Seychelles			(2, 8)
1873		Comoro Islands			(2)
1893		Comoro Islands			(5)
1870		Madagascar (Nosy-Be)			(2)
1880		Madagascar (Nosy-Be)			(7)
1880		Madagascar (Ste Marie)			(7)
1840		Madagascar			(5)
1890		Madagascar			(7)
Africa					
1852		French Congo (Gabon) near Libreville		Aubry-Lecomte	(2, 5, 6, 10)
1873		French Congo (Gabon) (Libreville)		Father Klaine Mission Sainte-Marie	(2, 5, 6, 10)
<1900	1901	Zanzibar			(10)
	1894	Independent State of Congo			(10)
Not specified		Cameroons (present Nigeria and Cameroon), Sao Tome, Sierra Leone, Lagos (Nigeria), German Eastern Africa (present Burundi, Rwanda and Tanganyika (Tanzania))			(10)
1912		Uganda	Ceylon		(8)
	1950's	Uganda			(9)

Table 2 continued

Introduction date	Cultivation date record	Localization	From	By	Ref.
Asia					
1835		India			(5)
1853		Ceylon		Dr. Thwaites, manager of the Botanical Garden of Peradeniya	(6)
1819		Botanical Garden of Buitenzorg (Java)	Botanical Garden of Antwerp	Marchal	(2, 6, 8)
	1846	Java			(5, 10)
	20th c.	Bali, Sulawesi, Java, Sumatra			(1)
1861		New-Caledonia		Botanist Pierre	(2)
1865		Indochina		Botanist Pierre	(2)
1883		Australia (Queensland)			(5)
Oceania					
<1900		Hawaii, Tahiti, Samoa, Fiji	Mexico		(5)
	1903			Hawaii Agricultural Experiment Station	(5, 10)

References are: (1): Bernard (2005); (2): Bouriquet (1954); (3): Childers and Cibes (1948); (4): Childers et al. (1959); (5): Correll (1953); (6): Lecomte (1901); (7): Lucas (1990); (8): Purseglove et al. (1981); (9): Ranadive (2005); (10): Ridley (1912)

'Classique' and which seems self-incompatible and lastly, the 'Variegata' type which exhibits leaves with white yellow stripes (Figure 2).

Possible origins of this phenotypic diversity

Four hypotheses can be proposed to explain the morphological variability in cultivation areas: (i) the existence of different introduction events, (ii) the accumulation of somatic mutations, (iii) the possible role of sexual recombination, and (iv) the existence of epigenetic phenomena:

(i) In most regions, different introduction events are often reported in the literature (Table 2). In Reunion Island, five successive vanilla introductions can be identified (Table 2). Following a poorly documented first introduction in 1793 (Ridley 1912), a second introduction occurred on June 27th, 1819. Commander Philibert and the botanist Perrotet brought back from Cayenne a 'big vanilla', possibly *V. pompona*, but all plants apparently disappeared (Lecomte 1901; Bouriquet 1954). The third introduction occurred on May 6th, 1820. Philibert and Perrotet brought back from the San-Matteo forest in the Manilla region (Philippines) a vanilla species of small size, which seemed new, possibly *V. planifolia*. All plants also supposedly disappeared (Lecomte 1901; Bouriquet 1954). The fourth introduction occurred on September 25th, 1822 when Marchant brought back *V. planifolia* from the Jardin du Roi in Paris a Mexican vanilla (Lecomte 1901; Bouriquet 1954). This introduction event is thought to be the first successful one and the origin of most vanilla plants cultivated in Reunion Island today. However there is no evidence that the first introduced vines actually disappeared or that other introduction events did not occur later, as reported by Lecomte (1901) with a fifth introduction in 1875, of a Mexican vanilla from Martinique. The observed phenotypic variation could therefore be the result of these different historical introduction events.

Genetic diversity studies were conducted on *V. planifolia* cultivated in Reunion Island and related species using RAPD (Besse et al. 2004) and AFLP markers (Duval et al. 2006). A high variability was revealed within *V. pompona* and may be related to its large area of dispersion, from Mexico to Paraguay (Portères 1954). Conversely, an important intra-specific homogeneity was observed within *V. planifolia*. A unique origin of the disseminated material for

Fig. 2 Morphological types from Reunion Island

this species may explain its high homogeneity. These results therefore confirm historical data indicating that the genetic secondary pool of *V. planifolia* in Reunion Island was probably constituted from one introduction event.

(ii) Vanilla is a vine with vegetative reproduction, and as such, can accumulate somatic point mutations, which may be responsible for morphological diversity, as observed for the colour and the shape of flowers and leaves (Dequaire 1976). These variants may then have been selected by vanilla growers and multiplied by cuttings. In an AFLP study (Duval et al. 2006), the level of genetic differentiation revealed in *V. planifolia* accessions cultivated in Reunion Island is indeed consistent with the hypothesis of an accumulation of somatic point mutations, as witnessed by the high number of rare alleles revealed. But this observed somatic point mutation diversity showed however no relationship with the observed morphological diversity, particularly for the two main morphological types cultivated on the island: 'Classique' and 'Mexique'.

(iii) In introduction areas, such as Reunion Island, vanilla crop must be hand-pollinated. Seed germination may occur from pods dropped down on vanilla plots. For instance, this was observed in Guadeloupe (Ph. Feldmann, pers. comm.). Moreover, in Reunion Island, rare natural pollination events are reported on high flowers, such flowers being often visited by the bird *Zosterops* (Zosteropidae) or by ants (P. Fontaine, Jardin des Parfums et des Epices, pers. com.). Interestingly, *Zosterops* was recently shown to be involved in the pollination of an Angraecoid Orchid in Reunion Island (Micheneau et al. 2006). In Madagascar, Delassus (1960) also describes seeds germinating in the wild, but seedlings rarely reach adult age. Although it is clear, according to these arguments, that sexual recombination is expected to be a rare phenomenon in the areas of introduction, it is important to keep in mind that a single sexual reproduction event is able to generate numerous genotypes that can be vegetatively propagated rapidly. The importance of sexuality in vegetatively reproduced crops and its impact on genetic diversity has been previously shown for yam (Scarcelli et al. 2006) and cassava (Elias et al. 2001). In Reunion Island, AFLP analysis revealed a large majority of relatively homogeneous accessions (Duval et al. 2006), but a few individuals exhibited very different

genotypes. It is therefore probable that sexual reproduction may have played a role in the apparition of morphological variability. The development of molecular tools with higher resolution and co-dominance may help to detect the occurrence of rare sexual multiplication and unravel additional genetic diversity thus explaining some of the observed morphological diversity.

(iv) Lastly, mechanisms of epigenetic origin may also be responsible for the observed phenotypic variations in the absence of congruent genetic variation. Such epigenetic variations may include various methylation states of DNA cytosines. These are responsible for the regulation of gene expression, and were shown to be transmitted through vegetative propagation (Xiong et al. 1999; Bretó et al. 2001; Imazio et al. 2002; Kalisz and Purugganan 2004). The study of cytosine methylation is now possible on a large scale using the Methylation Sensitive Amplified Polymorphism analysis (MSAP) (Reyna-López et al. 1997). This technique could be applied to cultivated *Vanilla* accessions to see if such epigenetic phenomena could explain morphological variation (in the absence of genetic variation). Other epigenetic phenomena have been described such as modifications on particular histone residues, histone variants in chromatin, DNA looping in chromatin conformation and higher-order chromatin structure (Mager and Bartolomei 2005). However, these are more difficult to analyze routinely and on a large sampling.

Our recent study revealed that polyploidization could also explain the morphological variation in cultivated species (Duval et al. 2006). Most of the data found in the literature indicate a basic chromosome number $n = 16$ and $2n = 32$ for *V. planifolia* (Hoffmann 1929, 1930; Heim 1954; Chardard 1963; Martin 1963) but various numbers (from 13 to 53) are also commonly reported (Hurel-Py 1938; Nair and Ravindran 1994). Moreover, the occurrence of different ploidy levels is mentioned for *V. tahitensis* ((Tonier 1951), in: (Soto Arenas 2003) and was confirmed using flow cytometry, revealing two ploidy levels (diploid and tetraploid) in this species, with triploid artificial hybrids (Duval et al. 2006). Preliminary results obtained for cultivated *V. planifolia* in Reunion Island also seem to reveal a similar pattern of variation (Duval et al. 2006) and this is currently further investigated.

Preservation of vanilla genetic resources

The primary *V. planifolia* gene pool is severely threatened in its area of origin by deforestation, and overcollecting in order to establish crop, both leading to the extinction of wild populations, and sometimes by poor crop management (Soto Arenas 1999b, 2006a). For over 20 years, M.A. Soto Arenas, an orchid and vanilla botanical expert, has explored southern Mexico looking for wild *V. planifolia* specimens. He found less than thirty genuine wild specimens spreading naturally (Ecott 2004). These natural populations, source of new diversity, are about to disappear. In the main production area of Veracruz, no wild population is known but northern Oaxaca, near Tuxtepec (Fig. 1), is important as a centre for vanilla diversity (Lubinsky 2003). Some wild specimen were collected (1882–1955) in Guatemala and Belize, but none was found in recent prospections (Soto Arenas 1999b). The best way to preserve vanilla genetic resources should be *in situ* conservation in its natural habitat. Unfortunately, these areas are under high human pressure and *in situ* conservation cannot be a viable alternative if it is not connected to global area conservation strategies (Soto Arenas 1999b). If such a strategy was to be developed, it should be focused in the Oaxaca region in order to preserve the few remaining *Vanilla* genetic resources (Lubinsky 2003).

The secondary gene pool, represented by closely related species of *V. planifolia*, and the pool of local varieties maintained in *V. planifolia* introduction areas, must also be protected. Some desirable characters from the secondary gene pool can be used for breeding, such as self-pollination, root-rot and virus resistance, larger fruit set, less photoperiod dependence for flowering, better aromatic profile, and pod indehiscence (Soto Arenas 1999a; Bénézet et al. 2000; Leclerc-Le Quillec et al. 2001).

Ex situ conservation is in the present conditions the best strategy to preserve vanilla genetic resources. The establishment of germplasm banks in the field or in vitro is therefore essential to perpetuate the existent genotypes and to improve vanilla breeding and production. To date, several collections have thus been established worldwide.

In Madagascar, IRAM (Institut de Recherches Agronomiques à Madagascar) and IRAT (Institut de

Recherches Agronomiques Tropicales) led vanilla breeding programs in the 1950–1980's in the research station of Ambohitsara near Antalaha. A collection of approximately one hundred species was established in 1974 (FOFIFA 1990) from introduced exotic species and species collected locally. By the end of the 1990's, only 22 species remained as well as about 250 hybrids resulting from former breeding programs (Grisoni et al. 1997). Nowadays unfortunately, this collection is abandoned.

Weiss (2002) mentions the existence of two germplasm collections. The first collection in CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) of Turrialba (Costa Rica) includes Central American accessions, and has recently suffered from *Fusarium* infection (Lubinsky 2004). The second collection is in NRCS (National Research Centre for Spices) of Calicut (India), now IISR (Indian Institute of Spices Research), and comprises 28 vanilla accessions. Minoo (2006a) cites an in vitro gene bank at IISR with more than 300 genotypes including four Indian *Vanilla* species, exotic, indigenous, seedling progenies and somaclones. This collection has a long-term purpose of exchange.

In Princeton (New Jersey), wild Mexican species have been gathered in the 1990's by Soto Arenas during a prospecting programme led by the Union Camp Corporation (now the International Paper company) (Lubinsky 2004). No more information can be found in terms of access and exchange.

Several botanical gardens possess some vanilla specimens in greenhouses, such as: Jardin des Plantes (Nantes, Montpellier), Jardin Botanique du Parc de la Tête d'Or (Lyon), Serres d'Auteuil (Paris), Jardin du Luxembourg (Sénat, Paris), Botanical Garden of the University of Copenhagen, Botanical Gardens of Antananarivo (Madagascar) and Royal Botanic Gardens of Kew. Moreover, there are collections by orchid hobbyists throughout the world that probably contain vanilla species. Since 1983, M. Pignal, curator at the Museum National d'Histoire Naturelle of Paris, has been setting up a vanilla collection of wild species in the Jardin des Plantes of Cherbourg, from prospections in Brazil, French Guyana and Costa Rica (Rongier 2006).

In the Pacific, Etablissement Vanille de Tahiti (EVT, French Polynesia) and the Secretary of the Pacific Community (SPC, Fiji) have handled a collection of about 250 accessions (Guarino 2004) covering 20 cultivars of *V. tahitensis* from French Polynesia and a few *V. planifolia* and hybrids (Wong 2005).

In Reunion Island, a collection of vanilla genetic resources started in 2002 and comprises today over 500 accessions including over 200 vines maintained in shade-houses. The collection contains a sample set of cultivated species and approximately thirty related species (Grisoni et al. 2006).

Botanical Gardens, SPC and Reunion accessions are available for exchange depending on their legal status (MTA).

Lastly, the CITRO (Centro de Investigaciones Tropicales) of the University of Veracruz sets out to initiate the creation of a Botanical Garden where the maximal amount of species (wild and cultivated) of the existing *Vanilla* types from Mexico and elsewhere will be collected. Many institutions contribute to this collection as the University of California, Herbario AMO (Asociación Mexicana de Orquídeas), the INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) and the EVT (http://www.uv.mx/). At present, we do not know the status of this collection in terms of access and exchange.

Conclusions

Efforts are necessary to revise the taxonomy of the genus *Vanilla*, which remains unclear, and to clarify its place within the Orchidaceae family on the basis of molecular phylogenetics. One interesting proposition was made by Cameron (2005a) aiming to set up a bar code system for vanilla. He suggests the use of the ITS region and the *psb*A-*trn*H intergenic spacer that were sequenced for over 50 vanilla accessions collected worldwide. The bar code project is particularly interesting as it may allow routine identification of *Vanilla* specimens to the species level, and perhaps even to the accession level, and may further allow the specific identification of processed pods. To build a robust phylogeny for the *Vanilla* genus, reference herbarium specimens will need to be included. For this purpose, the development of plastid mononucleotide microsatellites should be considered for vanilla (particularly when using degraded DNA samples extracted from herbarium material), as they have already been successfully used for bio-geographical studies in orchids (Micheneau 2002; Fay and Krauss 2003).

The reproductive mode of *Vanilla* species in natural conditions is also a questioning topic. Despite its numerous primitive characters, vanilla flowers show a structure and pollination mechanisms as complex as the ones observed in derived orchids. Floral morphology evolution in *Vanilla* could be a model study to understand the evolution of orchids with one anther (Soto Arenas 1999b). Evolutionary inferences can also be made from further studies on fragrant flowers and fruits interactions with orchid bees, as *Vanilla* is the most primitive orchid genus to demonstrate this interaction (Lubinsky et al. 2006).

As detailed earlier, unravelling the mechanisms (sexual reproduction, somatic mutation, epigenetics...) responsible for the phenotypic variation observed for *V. planifolia* in introduction areas will be as well an exciting issue to pursue.

Finally, polyploidization is an additional phenomenon that may be at the origin of the morphological variation observed in cultivated species. This could also represent an important phenomenon in the evolution of the *Vanilla* genus.

A joint international effort is now essential to protect and study vanilla in its area of origin, where it is highly endangered, as well as in introduction areas, where it is considered as a patrimonial resource with traditional cultivation practices going back to the 19th century.

References

Ackerman JD (1986) Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. Lindleyana 1(2):108–113

Arditti J, Ghani AKA (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytol 145:367–421

Bénézet H, Picard E, Côme B et al. (2000) Les virus du vanillier à la Réunion : un frein au développement de la culture sous ombrière. Phytoma la défense des végétaux 526:40–42

Bernard F (2005) Vanilla in Indonesia. In: First International Congress, Princeton, NJ, USA, 11–12 Nov 2003

Besse P, Da Silva D, Bory S et al. (2004) RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. Plant Sci 167:379–385

Bory S (2004) Diversité des vanilliers cultivés—Utilisation de marqueurs microsatellites et AFLP. Mémoire de DEA, Université de Montpellier II—ENSAM

Bouriquet G (1954) Le vanillier et la vanille dans le monde. Encyclopédie Biologique XLVI. Lechevalier, Paris VI

Bretó MP, Ruiz C, Pina JA et al. (2001) The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. Mol Phylogenet Evol 21(2):285–293

Bruman H (1948) The culture history of Mexican Vanilla. Hispanic Am Historical Rev 28(3):360–376

Cameron KM (1996) Phylogenetic relationships of the vanilloid orchids: an integration of molecular, with anatomical and morphological data. Doctoral Dissertation, University of North Carolina, Chapel Hill, NC

Cameron KM (1999) Biogeography of Vanilloideae (Orchidaceae). In: XVI International Botanical Congress, Abstracts. St Louis, Missouri, pp. 25–26

Cameron KM (2000) Gondwanan biogeography of Vanilloideae (Orchidaceae). In: Southern Connections Congress, Programmes and Abstracts, p. 749, Lincoln, New Zealand

Cameron KM (2003) Vanilloideae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) Genera Orchidacearum: Orchidoideae, Oxford University Press, USA

Cameron KM (2004) Utility of plastid *psa*B gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. Mol Phylogenet Evol 31(3):1157–1180

Cameron KM (2005a) DNA Barcoding as a method for vanilla species identification. In: Vanilla 2005 Mexico. The International Symposium on the Vanilla Business, Veracruz, Mexico, 15–16 Nov 2005

Cameron KM (2005b) Recent Advances in the Systematic Biology of *Vanilla* and Related Orchids (Orchidaceae: subfamily Vanilloideae). In: First International Congress, Princeton, NJ, USA, 11–12 Nov 2003

Cameron KM, Chase MW (1998) Seed morphology of vanilloid orchids (Vanilloideae: Orchidaceae). Lindleyana 13(3):148–169

Cameron KM, Chase MW (1999) Phylogenetic relationships of Pogoniiae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern north America-eastern Asia phylogeographic disjunction. J Plant Res 112:317–329

Cameron KM, Chase MW, Whitten WM et al. (1999) A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbc*L nucleotide sequences. Am J Bot 86(2):208–224

Cameron KM, Dickison WC (1998) Foliar architecture of vanilloid orchids: next term insights into the evolution of reticulate leaf venation in monocotyledons. Bot J Linn Soc 128(1):45–70

Cameron KM, Molina MC (2006) Photosystem II gene sequences of *psb*B and *psb*C clarify the phylogenetic position of *Vanilla* (Vanilloideae, Orchidaceae). Cladistics 22(3):239–248

Castillo Martinez R, Engleman EM (1993) Caracterizacion de dos tipos de *Vanilla planifolia*. Acta Bot Mex 25:49–59

Chardard R (1963) Contribution à l'étude cyto-taxinomique des orchidées. Rev Cyt et Biol Vég 26(1):1–58

Childers NF, Cibes HR (1948) Vanilla culture in Puerto Rico. Circular No 28, Federal Experiment Station in Puerto Rico of the United States Department of Agriculture, Washington DC

Childers NF, Cibes HR, Hernández-Medina E (1959) Vanilla—the orchid of commerce. In: Withner CL (ed) The orchids. A Scientific Survey, Ronald Press Co., New York

Cibrian Jaramillo A (1999) Variacion genética de *Vanilla planifolia* en México. Ph.D. dissertation

Colunga-GarciaMarin P, Zizumbo-Villareal D (2004) Domestication of plants in maya lowlands. Econ Bot 58:101–110
Correll DS (1953) Vanilla, botany, history, cultivation and economic importance. Econ Bot 7(4):291–358
Delassus M (1960) La lutte contre la fusariose du vanillier par les méthodes génétiques. L'Agronomie Tropicale 15: 245–246
Dequaire J (1976) L'amélioration du vanillier à Madagascar. Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée 23(7–12):140–158
Diaz EC (1989) Manual para el cultivo de vainilla en la region de Papantla Veracruz Mexico. Papantla, Vercruz, Mexico
Dressler RL (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland, OR
Dressler RL, Dodson C (1960) Classification and phylogeny of the Orchidaceae. Ann Mo Bot Gard 47:25–68
Duval M-F, Bory S, Andrzejewski S et al. (2006) Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. Les Actes du BRG 6:181–196
Ecott T (2004) Mexican money. In: Vanilla: Travels in search of the Luscious Substance. Penguin books, London (GB)
Elias M, Penet L, Vindry P et al. (2001) Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. Mol Ecol 10:1895–1907
Fay MF, Krauss SL (2003) Orchid conservation genetics in the molecular age. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds) Orchid conservation. Natural History Publications, Borneo
FOFIFA (1990) Le vanillier. Bilan de la Recherche Agricole à Madagascar, pp 112–119
Goldman DH, Freudenstein JV, Kores PJ et al. (2001) Phylogenetics of Arethuseae (Orchidaceae) based on plastid *matK* and *rbcL* sequences. Syst Bot 26(3):670–695
Govaerts R, Campacci MA, Holland Baptista D et al. (2006) World Checklist of Orchidaceae. http://www.kew.org/wcsp/monocots/. Accessed 29 May 2006
Grisoni M, Besse P, Bory S et al. (2006) Towards an international plant collection to maintain and characterize the endangered genetic resources of vanilla. In: International Horticultural Conference (IHC2006), Seoul, Korea, 13–19 Aug 2006
Grisoni M, Côme B, Nany F (1997) Projet de relance de la vanilliculture dans la région du SAVA. Compte-Rendu de Mission à Madagascar, La Réunion
Gustafsson S (2000) Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. Mol Ecol 9:1863–1872
Heim P (1954) Le noyau dans le genre Vanilla. In: Lechevalier P (ed) Le vanillier et la vanille dans le monde, Paris
Hoffmann KM (1929) Zytologische Studien der Orchidaceen (Vorläufige Mitteilung.). Ber Deut Bot Gesell 47:321–326
Hoffmann KM (1930) Beiträge zur Cytologie des Orchidaceen. Planta 10:523–595
Hurel-Py G (1938) Etude des noyaux végétatifs de *Vanilla planifolia*. Revue de Cytologie et de Cytophysiologie Végétales 3:129–133
Imazio S, Labra M, Grassi F et al. (2002) Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. Plant Breed 121(6):531–535
Kalisz S, Purugganan MD (2004) Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. Trends Ecol Evol 19(6):309–314
Kocyan A, Qiu Y-L, Endress PK et al. (2004) A phylogenetic analysis of Apostasioideae (Orchidaceae) based on ITS, *trn*L-F and *mat*K sequences. Plant Syst Evol 247(3–4):203–213
Kores PJ, Molvray M, Weston PH et al. (2001) A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. Am J Bot 88(10):1903–1914
Leclerc-Le Quillec F, Rivière C, Lagorce A (2001) Spread of Cymbidium Mosaïc Potexvirus and potyviruses in vanilla plants grown in shade houses in Reunion Island. Fruits 56(4):249–260
Lecomte H (1901) Le vanillier: sa culture, préparation et commerce de la vanille. Naud, Paris
Lopez PR (1900) La vainilla, su cultivo y beneficio. Litografia o imprenta "El Monograma", Mexico, DF
Lubinsky P (2003) Conservation of wild Vanilla. In: First International Congress on the Future of the Vanilla Business. Princeton, NJ, USA, 11–12 Nov 2003
Lubinsky P (2004) Vanilla diversity in Mexico. In: Bakto Flavors, Rutgers University (eds) Vanilla 2004 Europe, Second International Congress, Cannes, France, 30 Sept–01 Oct 2004
Lubinsky P, Van Dam M, Van Dam A (2006) Pollination of vanilla and evolution in Orchidaceae. Orchids 75(12):926–929
Lucas R (1990) La Réunion, île de Vanille. Océan Editions, St André, La Réunion
Macedo Reis CA (2000) Biologia reprodutiva e propagacao vegetativa de *Vanilla chamissonis* Klotzsch: subsidios para manejo sustentado. Escola Superior de Agric Luiz de Queiroz, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil
Mager J, Bartolomei MS (2005) Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. Nat Genet 37(11):1194–1200
Martin FW (1963) Chromosome number and behavior in a *Vanilla* hybrid and several Vanilla species. Bull Torrey Bot Club 90:416–417
Micheneau C (2002) Relations phylogénétiques des Neottieae (Orchidaceae) et étude de la variabilité génétique de *Cephalanthera longifolia* à l'aide de marqueurs moléculaires (séquençage et microsatellites chloroplastiques). Mémoire de DEA, Université Paul Sabatier, Toulouse
Micheneau C, Fournel J, Pailler T (2006) Bird Pollination in an Angraecoid Orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). Ann Bot 97:965–974
Minoo D, Nirmal Babu K, Peter KV (2006a) Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. Sci Horti 110(2):175–180
Minoo D, Nirmal Babu K, Ravindran PN et al. (2006b) Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. Sci Horti 108(4):414–422
Nair RR, Ravindran PN (1994) Somatic association of chromosomes and other mitotic abnormalities in *Vanilla planifolia* (Andrews). Caryologia 47(1):65–73
Nielsen RL (2000) Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W.Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. Bot J Linn Soc 133(3):285–302

Nielsen RL, Siegismund HR (1999) Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). Heredity 83(5):560–567

Portères R (1951a) Le problème des migrations végétales transpacifiques d'Asie en Amérique à l'Epoque Tertiaire et la distribution des espèces de Vanilliers. Rev Intern Bot Appl Agric Trop:290–294

Portères R (1951b) Observations sur le Vanillier de Tahiti. Bulletin de la Société Botanique de France 98(4–6):1 26–127

Portères R (1953) Le potentiel de variation clonale de *Vanilla tahitensis* J.W. Moore. L'Agronomie Tropicale 8(6): 639–640

Portères R (1954) Le genre *Vanilla* et ses espèces. In: Lechevalier P (ed) Le vanillier et la vanille dans le monde. Paris

Purseglove JW, Brown EG, Green CL et al (1981) Chapter 11: Vanilla. In: Longman (ed) Spices: Tropical Agricultural Series. London

Ranadive AS (2005) Vanilla cultivation. In: First International Congress, Princeton, NJ, USA, 11–12 Nov 2003

Reyna-López GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J (1997) Differences in DNA methylation pattern are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. Mol Gen Genet 253:703–710

Ridley HN (1912) Chapter II: Vanilla. In: The MacMillan Co. (ed) Spices, New York

Rongier A (2006) Des vanilliers cherbourgeois. L'orchidophile n°171 37(4):257–266

Scarcelli N, Tostain S, Vigouroux Y et al. (2006) Farmers' use of wild relative and sexual reproduction in a vegetatively propagated crop. The case of yam in Benin. Mol Ecol 15:2421–2431

Schlüter PM (2002) RAPD variation in *Vanilla planifolia* Jackson (Orchidaceae) and assessment of the putative hybrid *Vanilla tahitensis* Moore. MBiochem Thesis, University of Oxford

Soliva M, Gautschi B, Salzmann C et al. (2000) Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. Mol Ecol 9(12):2178

Soto Arenas MA (1999a) Conservation of the genetic resources of *Vanilla*. PhD dissertation (abstract), UNAM University

Soto Arenas MA (1999b) Filogeografia y recursos genéticos de las vainillas de México. http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ101.pdf. Cited 31 Mar 1999

Soto Arenas MA (2003) Vanilla. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) Genera orchidacearum: Orchidoideae, Oxford University Press, USA

Soto Arenas MA (2006a) La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. Biodiversitas 66:2–9

Soto Arenas MA (2006b) Vainilla: los retos de un cultivo basado en una especie amenazada con una historia de vida compleja. In: Consejo Veracruzano de la Vainilla (ed) Congreso Internacional de Productores de Vainilla, Papantla, Veracruz, Mexico, 26–28 May 2006

Stehlé H (1952) Le vanillier et sa culture. Fruits 7(2):50–56, 99–112, 253–260

Stern WL, Judd WS (1999) Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (Orchidaceae). Bot J Linn Soc 131(4):353–382

The International Plant Names Index (2004) Published on the Internet http://www.ipni.org. Accessed 09 Dec 2004

Tonier JP (1951) Note technique annexée au rapport annuel 1951 du laboratoire d'étude sur le vanillier. Madagascar

Torregrossa JP (1988) La pollinisation du vanillier. Bulletin Agronomique des Antilles et de la Guyane 8:39–41

Weiss EA (2002) Chapter 7: Orchidaceae. In: Spice Crops, CAB International, CABI publishing, Wallington, UK

Wong M (2005) Germplasm collection of *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. In: Vanilla 2005 Mexico, The International Symposium on the Vanilla Business, Veracruz, Mexico, 15–16 Nov 2005

Xiong LZ, Xu CG, Maroof MAS et al. (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Mol Gen Genet 261:439–446

II. Conclusions de l'introduction bibliographique

A l'issue de cette synthèse bibliographique, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la variabilité phénotypique de l'espèce *Vanilla planifolia* observée dans les zones d'introduction (en particulier à La Réunion) en condition de reproduction végétative prédominante et en l'absence de pollinisateurs naturels. Cette variabilité concerne les types 'Mexique', 'Aiguille', 'Grosse Vanille', 'Stérile', 'Variegata', par rapport au type prédominant dit 'Classique'.

Dans le cadre de cette thèse, trois premières hypothèses (i) existence de différents évènements d'introduction, (ii) accumulation de mutations somatiques et (iii) rôle possible de la reproduction sexuée, ont été testées avec deux types de marqueurs moléculaires, les AFLP (polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) et les microsatellites. Le deuxième chapitre détaille donc les résultats obtenus au cours de cette étude génétique. Un premier article (soumis) expose les schémas d'introduction et de diversification de *V. planifolia* à La Réunion révélés par AFLP et compare ses niveaux de diversité à ceux de trois espèces apparentées, *V. tahitensis*, *V. bahiana* et *V. pompona*. Un deuxième article (publié) décrit la mise au point de la technique des microsatellites et leur utilisation pour étudier la diversité génétique des espèces cultivées *V. planifolia* et *V. tahitensis*. Il décrit aussi la transférabilité de ces marqueurs pour d'autres espèces du genre *Vanilla*. Cet article est directement suivi par une application des microsatellites dans la détection de phénomènes d'hybridation interspécifiques et la résolution de la phylogéographie du genre *Vanilla*.

L'hypothèse supplémentaire (iv) de l'existence d'une polyploïdie chez *V. planifolia* et ses conséquences phénotypiques est détaillée dans le troisième chapitre, consacré à l'analyse cytogénétique des vanilliers. Une première étude (soumise) porte sur l'importance évolutive de la polyploïdie chez *V. planifolia*. Elle est complétée par une analyse à l'échelle du genre *Vanilla*, et plus spécifiquement chez *V. pompona* (article en préparation).

Enfin, l'hypothèse (v) de l'existence de variations épigénétiques a été testée par l'utilisation de marqueurs MSAP (polymorphisme de sensibilité à la méthylation) et est détaillée dans le quatrième chapitre.

Une synthèse du matériel végétal utilisé dans ces différentes études est présentée en Annexe 2.

La dernière partie de cette thèse présente un bilan des résultats obtenus lors des différentes études génétiques, cytogénétiques et épigénétiques, et propose des perspectives de recherche.

Chapitre 2

ANALYSE GÉNÉTIQUE

VANILLE ; ſubſtantif féminin. *Vanilla.* Plante qui croît en Amérique, & dont le fruit qu'on nomme auſſi *vanille*, eſt d'une ſaveur aromatique, & d'une odeur très-agréable, & entre dans la compoſition du chocolat.

La plante grimpe & s'entortille le long des arbres : ſa tige eſt de la groſſeur du doigt ; elle eſt noueuſe ; ſes nœuds ſont écartés d'environ trois pouces, & donnent naiſſance chacun à une feuille. Les feuilles ſont diſpoſées alternativement, pointues, en forme de lance, molles, & un peu âcres au goût : la tige pouſſe des rameaux, aux extrémités deſquels paroiſſent les fleurs qui ſont polypétales, irrégulières, compoſées de ſix feuilles, dont cinq ſont diſpoſées comme celles des roſes. Les feuilles de la fleur ſont oblongues, étroites, tortillées, ondées, très blanches en - dedans, verdâtres en - dehors. La ſixième feuille ou le *nectarium*, qui eſt auſſi très-blanche, occupe le centre ; elle eſt roulée en manière d'aiguière. Aux fleurs ſuccède une eſpèce de petite gouſſe, molle, charnue, preſque de la groſſeur du petit doigt, d'un peu plus d'un demi-pied de longueur, d'un roux noirâtre lorſqu'elle eſt mûre & remplie d'une infinité de petites graines noires & luiſantes.

On diſtingue trois ſortes de vanilles : la première, dont la gouſſe eſt plus groſſe & plus courte, eſt appelée par les Eſpagnols, *pompona* ou *bova*, c'eſt-à-dire, enflée ou bouffie. La ſeconde, dont la gouſſe eſt plus mince & plus longue, eſt la légitime : on la nomme *vanille de ley* ou *leg.* La troiſième, dont la gouſſe eſt la plus petite de tous ſens, s'appelle *Simaroma* ou *bâtarde.* Ces variétés peuvent venir, ou de la nature des terroirs, ou du temps auquel on les recueille. Les Indiens gliſſent toujours quelques gouſſes de pompona & de Simaroma dans les paquets de la *vanille leg.*

La première a une odeur trop forte pour être agréable ; la ſeconde qui eſt la légitime, eſt la ſeule dont on faſſe uſage ; la troiſième eſt la moins odorante : elle contient auſſi moins de graines & de liqueur. On nous apporte quelquefois des gouſſes de vanille monſtrueuſes pour la groſſeur : elles ſont courtes, d'une odeur de prunes : on leur donne le nom de *vanille de l'Indoſtan.* Lorſque les gouſſes de vanille ſont récentes, elles ſont un peu molles, rouſſâtres, huileuſes, graſſes, cependant caſſantes : la pulpe qu'elles contiennent eſt rouſſâtre, huileuſe, & remplie d'une infinité de petits grains noirs, luiſans, ayant une forte odeur du *baume du Pérou.* Ces gouſſes ſont quelquefois recouvertes d'une fleur ſaline & brillante, qui n'eſt que le ſel eſſentiel dont ce fruit eſt rempli, & qui ſort au-dehors quand on nous l'apporte dans un temps trop chaud.

La récolte de la vanille ſe fait pendant les mois de Novembre & Décembre. Les Mexicains lient ces gouſſes par le bout, & les mettent à l'ombre pour les faire ſécher ; car l'humidité ſuperflue pourroit les faire corrompre : enſuite ils les applatiſſent doucement, & les oignent ſoigneuſement avec un peu d'huile de coco ou de calba pour les rendre ſouples, & empêcher qu'elles de ſe briſent & ne rident trop. Puis ils les mettent par paquets de cinquante, de cent ou de cent cinquante gouſſes pour les envoyer. [...]

On dit qu'il y a certains Marchands au Mexique qui connoiſſant le prix qu'on met en Europe à la vanille, ont ſoin, après avoir cueilli ces ſortes de gouſſes, de les ouvrir & d'en retirer la pulpe aromatique, d'y ſubſtituer des paillettes ou d'autres corps étrangers, & d'en boucher les ouvertures avec un peu de colle, ou de les coudre adroitement, enſuite de les entremêler avec la bonne vanille. Les endroits où l'on trouve la vanille en plus grande quantité, ſont la côte de Caragne & de Carthagène, l'Iſthme de Darien, & toute l'étendue qui eſt depuis cet iſthme & le golfe de Saint-Michel, juſqu'à Panama, le Jucatan & le Honduras. On en trouve auſſi dans la Terre Ferme de Cayenne dans les endroits frais & ombragés. [...]

Extrait de LE GRAND VOCABULAIRE FRANÇOIS. PAR UNE SOCIÉTÉ DE GENS DE LETTRES. TOME VINGT-NEUVIÈME. 1773. pp.160-161.

CHAPITRE 2 : ANALYSE GÉNÉTIQUE

I. Préambule

Le deuxième chapitre de cette thèse est consacré à l'analyse génétique des vanilliers. L'objectif de ce chapitre est donc de tester les hypothèses (i) existence de différents évènements d'introduction, (ii) accumulation de mutations somatiques et (iii) rôle possible de la reproduction sexuée, pouvant expliquer la variation phénotypique de l'espèce *Vanilla planifolia* en particulier, observée dans ses zones d'introduction (spécifiquement à La Réunion). Pour cela, deux méthodes d'analyses ont été utilisées : l'AFLP (polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) et les microsatellites.

Le premier article de ce chapitre (soumis) présente une analyse génétique par AFLP des schémas d'introduction et de diversification de *V. planifolia* à La Réunion. Les niveaux de diversité d'espèces américaines cultivée (*V. tahitensis*) et spontanées (*V. pompona*, *V. bahiana)* génétiquement et taxonomiquement proches de *V. planifolia* ont été incluses pour comparaison. Cet article révèle un faible niveau de diversité génétique parmi les accessions de *V. planifolia* cultivées à La Réunion, à l'exception du phénotype 'Aiguille' qui est probablement issu d'un évènement rare de reproduction sexuée. Les *V. planifolia* cultivées de nos jours dans les îles de l'Océan Indien, du Pacifique et des Antilles semblent dériver d'un seul clone introduit dans les différentes régions.

Le deuxième article de ce chapitre (publié) présente la mise au point de 14 marqueurs microsatellites, développés chez l'espèce cultivée *V. planifolia* pendant mon DEA et évalués au cours de la thèse pour leur transférabilité à d'autres espèces du genre *Vanilla*. Cette étude confirme les faibles niveaux de diversité présents chez les *V. planifolia* cultivées.

Enfin, en troisième partie de ce chapitre sont présentés des résultats complémentaires sur l'application des deux locus microsatellites mVplCIR025 et mVplCIR031 utilisés pour affiner la résolution des résultats obtenus par AFLP d'une part, et l'intérêt du mVplCIR031 pour la différenciation phylogéographique au

niveau du genre *Vanilla* est démontré d'autre part. Ils ont permis de confirmer les faibles niveaux de diversité intraspécifique détectés chez *V. planifolia* et *V. tahitensis* et ils ont fourni des informations supplémentaires sur les espèces *V. pompona* et *V. bahiana*. Ils ont également montré l'importance des évènements d'hybridation dans le genre. Le microsatellite mVplCIR031 a mis en évidence une bonne différenciation phylogéographique entre les espèces d'Amérique et les espèces d'Afrique/Asie.

Article N°2 :

Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean)

Séverine BORY [1,5] - Pesach LUBINSKY [2] - Ange-Marie RISTERUCCI [3] – Jean-Louis NOYER [3] - Michel GRISONI [1] - Marie-France DUVAL [4] - Pascale BESSE [5]

[1] CIRAD, UMR PVBMT Cirad - Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

[2] Plant Resources Informatics Laboratory (PRIL), Department of Botany and Plant Sciences – 072, University of California, Riverside, CA 92521-0124

[3] CIRAD, UMR DAP, Avenue Agropolis, TA A-96/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France

[4] CIRAD, UPR Multiplication Végétative, Boulevard de la Lironde, TA A-75/02, 34398 Montpellier cedex 5, France

[5] Université de La Réunion, UMR PVBMT Cirad - Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis messag cedex 9, La Réunion, France

Soumis à :

American Journal of Botany, MS # 2007-332

Mots clés : AFLP, diversification, diversité génétique, Orchidaceae, *Vanilla planifolia*, reproduction végétative

Résumé

L'espèce cultivée *Vanilla planifolia* est un exemple typique de plante cultivée à reproduction végétative introduite depuis son aire d'origine (l'Amérique) vers de nouvelles régions où ses pollinisateurs naturels sont absents. Dans ces conditions, comment peuvent être expliquées les variations phénotypiques observées parmi les cultivars de *Vanilla* dans les zones d'introduction telles que l'île de La Réunion (Océan Indien) ? Elles pourraient être le résultat de différents évènements d'introduction, de mutations somatiques ou de la reproduction sexuée (à travers la

pollinisation manuelle). Les marqueurs AFLP ont été utilisés pour élucider les schémas d'introduction de *V. planifolia* et ils montrent que la plupart des accessions cultivées de nos jours dans les îles de l'Océan Indien, de l'Océan Pacifique et des Antilles dérivent d'un seul génotype introduit, probablement du cultivar mexicain 'Mansa'. Les schémas de diversification de cette espèce cultivée ont été également étudiés. A l'exception d'un phénotype particulier ('Aiguille'), découvert à l'île de La Réunion, qui pourrait être issu de reproduction sexuée, les accessions cultivées présentent de très faibles niveaux de diversité génétique. Elles ont évolué grâce à l'accumulation de mutations ponctuelles à travers la multiplication végétative et la diversité génétique révélée ne peut pas expliquer toute la diversité phénotypique observée. D'autres explications possibles sont discutées. Un schéma de diversification similaire a été révélé pour *V. tahitensis*, espèce cultivée en Polynésie, et dérivant vraisemblablement de *V. planifolia*. Une analyse comparative des niveaux de diversité dans les espèces spontanées américaines génétiquement proches a révélé des niveaux faibles (*V. bahiana*) à élevés (*V. pompona*), corrélés avec la taille de leur aire naturelle de dispersion et la combinaison de modes de reproduction végétative et sexuée.

A2.1. Abstract

The cultivated species *Vanilla planifolia* is a typical example of a vegetatively propagated crop introduced from its area of origin (America) to new regions where natural pollinators are absent. In these conditions how can be explained the phenotypic variations observed among *Vanilla* cultivars in introduction area such as Reunion Island (Indian Ocean)? These could be the result of different introduction events, somatic mutations or sexual reproduction (through manual pollination). AFLP markers were used to elucidate the patterns of introduction of *V. planifolia* and it showed that most of the accessions cultivated today in the islands of the Indian Ocean, Pacific Ocean and West Indies derive from a single introduced genotype, possibly of the 'Mansa' cultivar from Mexico. The patterns of diversification of this cultivated species were also studied. Except for one particular phenotype ('Aiguille') found in Reunion Island, which may come from sexual reproduction, cultivated accessions exhibit very low levels of genetic diversity. They have evolved by the accumulation of point mutations through vegetative multiplication and the genetic diversity revealed cannot explain the phenotypic diversity observed. Other possible explanations are discussed. A similar pattern of diversification was revealed for *V. tahitensis*, a species cultivated in Polynesia, which was suggested to derive from *V. planifolia*. A comparative analysis of the levels of diversity in related spontaneous American species revealed low (*V. bahiana*) to high levels (*V. pompona*), correlated with the size of their area of natural dispersion and a combined vegetative/sexual reproduction.

A2.2. Introduction

Vanilla is both the world's most popular flavour and, by unit weight, among the most valuable of spice crops. The only true sources of natural vanilla are the cured fruits of two obligatorily hand-pollinated and clonally propagated orchids: 'Bourbon/Mexican vanilla' (*Vanilla planifolia* G. Jackson, syn. *V. fragrans* (Salisb.) Ames) and 'Tahitian vanilla' (*V. tahitensis* J.W. Moore). Some other aromatic

species are grown locally or harvested in the wild but have no economic importance, for example, *V. pompona* Schiede, called 'Vanillon' in the French West Indies and *V. odorata* C.Presl. in America (Soto Arenas, 2003). Of the estimated 2,300 MT of vanilla bean production per annum (in 2001;(Loeillet, 2003), roughly 95% derives from *V. planifolia*. The discovery in the mid-nineteenth century of a practical artificial method to pollinate vanilla manually signalled, by the 1870s, the rise and eventual dominance of the Indian Ocean (Madagascar, Reunion Island, Comoros) as the major vanilla exporting region in the world, a position it still maintains (Kouri, 2004).

In contrast to the enigmatic *V. tahitensis*, a species not known in the wild and found exclusively in cultivated or feral populations in French Polynesia and Papua New Guinea, *V. planifolia* is a rare (ca. 1 individual/2-10km^2) perennial herb endemic to humid evergreen forests in Mesoamerica (Portères, 1954; Soto Arenas, 1999b; Hagsater *et al.*, 2005). The aromatic fruit condition in the genus *Vanilla* Plumier ex Miller (Orchidaceae, (pantropical; ca. 110 species)) is reported to be present in 18 (Portères, 1954) to 35 (Soto Arenas, 2003) species from the neotropics/Caribbean, and could represent a synapomorphy for the genus (Soto Arenas, 1999b, 2003; Lubinsky *et al.*, 2006; Lubinsky, 2007).

As early as the mid-eighteenth century, cuttings of *V. planifolia* have begun to be introduced into Europe, not from Mexico into Spain, where vanilla bean imports were centred (Kouri, 2004), but from the West Indies into England. When or how *V. planifolia* made its way to the West Indies is unknown and/or unrecorded, but most probably was an introduction postdating Spanish arrival in the New World. The lectotype of *V. planifolia* was based on a plant introduced by the Marquis de Blanford from the West Indies and cultivated in the hothouse of the R. Hon. C. Greville in Paddington in the early 1800s. This same individual was propagated shortly thereafter throughout botanical institutions in continental Europe, and a widely subscribed viewpoint is that the entire stock of cultivated vanilla in the Indian Ocean and Indonesia derives from this single genetic individual (clone), the Blanford/Greville type, introduced into these regions essentially contemporaneously during the 1820s and 1830s by French and Dutch colonists, respectively (Correll, 1953; Bouriquet, 1954; Smith *et al.*, 1992; Soto Arenas, 2003; Ecott, 2004; Bory *et al.*, 2007).

In Reunion Island, five primary successive vanilla introductions are cited in the literature (Bory *et al.*, 2007), but it is generally admitted that only one (by Marchant in 1822) was successful, which would correspond to the introduction of the Blanford/Greville type. Cultural management of vanilla includes a strict regime of asexual propagation via cuttings and the exclusive "selfing" of flowers by artificial means (hand-pollination) to produce pods. In combination with its putative introduction history, diversity expectations are therefore very limited for Indian Ocean vanilla. Similar expectations have, however, not been found to hold when examining levels of genetic diversity in other clonally propagated crops of New World origin like potato (*Solanum*) (Brush, 2004; Spooner et Hetterscheid, 2006), cassava (*Manihot)* (Elias *et al.*, 2000; Elias *et al.*, 2004; Schaal *et al.*, 2006), *Stenocereus* (Casas *et al.*, 2006), *Opuntia* (Griffith, 2004), pepino (*Solanum*) (Blanca *et al.*, 2007), and oca (*Oxalis*) (Emshwiller et Doyle, 2002; Emshwiller, 2006), which have been demonstrated to be not just multi-clonal in constitution, but in many instances were shown also to maintain sufficiently high genetic variation so as to preclude the molecular detection of a domestication bottleneck. Often, different stable phenotypes of *V. planifolia* are described in cultivation in introduction areas. In Reunion Island, they differ by leaf color, shape and thickness, pods shape, stem thickness and self-fertility (Bory *et al.*, 2007). Two types are widespread in cultivation: the 'Classique' type has a light green color, flat leaves and pods that progressively narrow, and the 'Mexique' type has darker and more bluish leaves than 'Classique', with a central gutter and curved sides and pods that are cylindrical up to the stem (Bory *et al.*, 2007). Four other minor types were also found in cultivation following prospecting focused on the identification of peculiar phenotypes: the 'Aiguille' type, distinguishable from the 'Classique' type by its more slender leaves and a thin pod; the 'Grosse Vanille' type which resembles *V. pompona*, with bigger and thicker leaves and stem than 'Classique'; the 'Stérile' type with the same morphological characteristics than 'Classique' and which is self-sterile and lastly, the 'Variegata' type which exhibits leaves with white yellow stripes (Bory *et al.*, 2007).

Molecular characterizations (i.e., isozymes, RAPDs) of limited sampling of cultivated *V. planifolia* in the Indian Ocean and elsewhere have already shown there to be low levels of genetic diversity (Besse *et al.*, 2004; Minoo *et al.*, 2007), including in Mexico (Cibrian Jaramillo, 1999; Soto Arenas, 1999b; Schlüter, 2002), but have failed to discriminate distinct clusters of intraspecific genetic diversity. In order to refine genetic polymorphism resolution through a wider genome-scanning approach, amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were developed as they are ideally adapted to appraise germplasm because of their ability to generate and detect rapidly numerous polymorphisms (Krauss, 2000) that are largely distributed throughout the genome and for the high reproducibility of the method (Vos *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997). This AFLP diversity study was undertaken to elucidate the patterns of *V. planifolia* introduction and diversification in cultivation areas (Indian Ocean, Polynesia, West Indies), with a special focus on Reunion Island and the specific aim to explain the phenotypic variations observed in vanilla crop. In a recent review (Bory *et al.*, 2007), we suggested that these phenotypes could be the result (i) of different introduction events, (ii) of an accumulation of mutations through successive rounds of vegetative propagation or (iii) of sexual reproduction (through manual pollination or possible rare natural/accidental pollination events). In order to distinguish between clonal diversity and diversity representative of variations between non-clonal siblings, selfed progenies of the 'Classique' type were genotyped to characterize variations arising through sexual reproduction as opposed to strict asexual reproduction. Furthermore, levels of genetic diversity between spontaneous accessions of two American *Vanilla* species: *V. bahiana* Hoehne and *V. pompona* were also assessed to allow a comparison of spontaneous *versus* cultivated species.

TABLE 1. Code, type, place of collection of the sample and number of analyzed samples listed by species. Accession numbers are from the CIRAD vanilla collection (CRXXXX numbers) but the CR code was replaced by a code corresponding to species names to improve clarity.

Species	Code	Type	Place of collection	Number (+ repeats)
V. planifolia	**PL…**			**289 (+20)**
	PLac…	Acamaya	Mexico	1
	PLco…	Colibri	Mexico	3
	PLma…	Mansa	Mexico	17
	PLme…	Mestiza	Mexico	1
	PLob…	Oreja de Burro	Mexico	2
	PLvn…	Vainilla	Mexico	1
	PLa…	Aiguille	Reunion Island	2
	PLc…	Classique	Reunion Island	153 (+11)
	PLgv…	Grosse Vanille	Reunion Island	4
	PLm…	Mexique	Reunion Island	8 (+2)
	PLmg…	Magic	Reunion Island	2
	PLs…	Seedlings from self-pollination	Reunion Island	10 (+1)
	PLst…	Stérile	Reunion Island	2
	PLv…	Variegata	Reunion Island (1) and unknown (2)	3
	PL…		Brazil	2
	PL…		Pacific Ocean	10 (+1)
	PL…		Reunion Island	29 (+2)
	PL…		West Indies	5 (+1)
	PL…		Unknown	11

A2.3. Materials and methods

A2.3.1. Plant material and DNA extraction

The study focused on *V. planifolia* with 289 accessions surveyed (Table 1). This sample includes the six phenotypes that are grown and identified in Reunion Island (Bory *et al.*, 2007). These types were collected in Reunion Island fields and forests during extensive prospecting and are maintained *ex situ* in the CIRAD collection (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) (Grisoni *et al.*, 2007) or in the private collection of Provanille, both located in Reunion Island. All these phenotypic variations are stable as they were observed in the field and were maintained when accessions were transferred in the *ex situ* collections. Some *V. planifolia* self-progenies obtained from hand-pollination in Reunion Island were also analyzed. Other *V. planifolia* cultivated samples came from the Indian Ocean area (Madagascar) or other introduction areas (French Polynesia, French West Indies (Guadeloupe)) and were obtained from prospecting, exchanges with botanical gardens or private collections and introduced in the CIRAD collection. Mexican cultivated samples from the area of Veracruz ('Acamaya', 'Colibri', 'Mansa', 'Mestiza', 'Oreja de Burro') and from Chiapas ('Vainilla') were provided by the University California Riverside (USA) as DNA extracts. Finally, some spontaneous types collected in Costa Rica, Central America, Brazil and Guatemala and obtained from exchanges with botanical gardens or private collections were also included in the CIRAD collection and studied.

Some specimens from the cultivated species *V. tahitensis,* mainly supplied by the private collection of Etablissement Vanille de Tahiti (EVT) in French Polynesia, were also studied to provide information on the levels of genetic diversity and diversification processes in another cultivated species.

Spontaneous accessions from the American species *V. pompona* and *V. bahiana* that are genetically (Soto Arenas, 2003) and morphologically (Portères, 1954) related to *V. planifolia* were also studied to allow a comparison of the levels of genetic diversity between cultivated and spontaneous species. Accessions of *V. bahiana* originated from recent prospecting and were obtained from the Museum

V. tahitensis	**TA…**			**11 (+1)**
	TAh…	Haapape	French Polynesia	3
	TAp…	Parahurahu	French Polynesia	2
	TAr…	Rea Rea	French Polynesia	1
	TAt…	Tahiti	French Polynesia	2
	TA…		Madagascar	1 (+1)
	TA…		Papua New Guinea	1
	TA…		Unknown	1
V. pompona	**PO…**			**21 (+2)**
	PO…		French Polynesia	2
	PO…		Guadeloupe	6 (+1)
	PO…		Reunion Island	9
	PO…		Unknown	4 (+1)
V. bahiana	**BA…**		Brazil	**16 (+1)**
Hybrids	**HY…**			**6**
	HY0003 HY0130	Manitra Ampotony: PL x TAh	Madagascar	2
	HY0131	Tsy Taitry: (PL x PO) x PL	Madagascar	1
	HY0140	(PL x TA) x PO	Madagascar	1
	HY0747 HY0751	Tsy Taitry self-progenies	Madagascar	2
V. odorata	**OD…**		Unknown	**1**
not determined	**SP…**			**31 (+1)**
	SP0062 SP0070 SP0668		Brazil	3
	SP0068		Costa Rica	1
	SP0096 SP0680 SP0681 SP0683		French Guyana	4 (+1)
	SP0123 SP0124 SP0125 SP0126 SP0132 SP0134 SP0135 SP0136 SP0139		Madagascar	9
	SP0713 SP0715		Reunion Island	2
	SP0060 SP0090 SP0111 SP0166 SP0169 SP0170 SP0173 SP0180 SP0685 SP0701 SP0703 SP0706		Unknown	12

National d'Histoire Naturelle (MNHN, Paris). Accessions of *V. pompona* were obtained through prospecting (Guadeloupe, Reunion Island) or from exchanges with botanical gardens. Despite only a single accession of the species *V. odorata* was available, it was also added as it was suggested to be a parental species of *V. tahitensis* (Bory *et al.*, 2007). Artificial interspecific hybrids from breeding programs in Madagascar (Delassus, 1960; Dequaire, 1976; FOFIFA, 1990) were also studied (Table 1).

Finally, some unidentified accessions were obtained from botanical gardens and were also included in the analysis to unravel their taxonomic designation.
Accessions for which species name was provided and/or identified based on morphological observations or additional information provided by growers or botanists, were coded as PL for *V. planifolia*, TA for *V. tahitensis*, PO for *V. pompona*, BA for *V. bahiana*, OD for *V. odorata* and HY for hybrids. Accessions for which species identification was doubtful or unknown, either because information regarding species name was not available or because morphology did not correspond to the species description (according to Portères (1954)), were coded as SP.

DNA was extracted according to Risterucci *et al.* (2000) and purified on spin columns 100 (Sigma, St. Louis, Missouri). DNA concentrations of extracts were visually estimated by comparisons with dilutions of maize DNA samples of known concentration after electrophoresis on agarose gels.

A2.3.2. AFLP assay

The AFLP assay developed by Vos *et al.* (1995) was performed with the following modifications: 250 ng total genomic DNA were endonuclease-digested with 2.5 U *Eco*RI and 2.5 U *Mse*I with reaction buffer (AFLP Core Reagent Kit, Invitrogen, Carlsbad, California) for 2 h at 37°C in a final volume of 25 µL. Enzymes were inactivated for 15 min at 65°C. Ligation of digestion products was performed by adding *Eco*RI and *Mse*I double-stranded adapters (AFLP Core Reagent Kit, Invitrogen), 1 U T4 DNA ligase and T4 DNA ligase reaction buffer (AFLP Core Reagent Kit, Invitrogen) for 2 h at room temperature in a final volume of 50 µL. Preselective amplification was performed in a volume of 50 µL containing 5 µL of

TABLE 2. Name and sequence of selective amplification primers used in AFLP study.

Name	Sequence (5' to 3')
Eco-AAC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C
Eco-AGG	GAC TGC GTA CCA ATT CAG G
Mse-CAT	GAT GAG TCC TGA GTA ACA T
Mse-CAC	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
Mse-CAG	GAT GAG TCC TGA GTA ACA G
Mse-CTA	GAT GAG TCC TGA GTA ACT A
Mse-CTT	GAT GAG TCC TGA GTA ACT T

undiluted digestion-ligation products, PCR buffer (Red GoldStar, Eurogentec, Seraing, Belgium), 1.5 mM $MgCl_2$ (Red GoldStar), a mix of *Eco*+A and *Mse*+C primers containing dNTPs (AFLP Pre-Amp Primer Mix I, Invitrogen) and 1.5 U *Taq* polymerase (Red GoldStar). The PCR reaction was performed on a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, California) using the following parameters: 72°C for 2 min, 94°C for 2 min, 25 cycles 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 2 min, and a final elongation cycle 72°C for 10 min. Selective amplification was performed in a volume of 15 µL containing 5 µL of 1/20^{e} diluted preamplification products, PCR buffer (Red GoldStar), 0.2 mM of each dNTP (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts), 1.5 mM $MgCl_2$ (Red GoldStar), 0.1 µM *Eco*RI fluorescent selective primer (6-FAM dye, Applied Biosystems), 0.2 µM *Mse*I selective primer and 1.25 U *Taq* polymerase (Red GoldStar). Seven primers synthesized by Applied Biosystems were used (Table 2). The selective PCR reaction was performed on a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) using the following parameters: 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 65°C to 56°C for 30 s (-0.7°C/cycle for the 13 first cycles) followed by 72°C for 2 min and finally 72°C for 10 min. Fingerprint data were obtained by running a mix of 1 µL of amplified products, 10.7 µL of Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) and 0.3 µL of internal size standard GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) on a ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

A2.3.3. Data analysis

AFLP data were recovered from an ABI PRISM 3100 Genetic Analyser. Band alignments were completed using the GelCompar *II* software, 3.5 version (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Only the AFLP bands ranging from 75 bp to 500 bp were scored (1 if present, 0 if absent) and analyzed. Both modalities (0,1) were given equal weight to calculate Sokal and Michener dissimilarity indices (d_{i-j}) between pairs of accessions (Sokal et Michener, 1958) : $d_{i-j} = (n_{11} + n_{00}) / (n_{11} + n_{01} + n_{10} + n_{00})$, with n_{11} the number of fragments present in both i and j, n_{01} and n_{10} the number of fragments present in one accession but absent in the other, and n_{00} the number of fragments absent in both i and j. Phenetic trees were drawn with the Unweighted Neighbor-Joining algorithm and 1000 bootstraps were calculated

TABLE 3. Total number of AFLP fragments (TN), number of polymorphic fragments (NP) and percentage of polymorphism (P%) observed using seven AFLP primer pairs for the global analysis and for the four species intra-specific analyses.

	All species			*V. planifolia*			*V. tahitensis*			*V. pompona*			*V. bahiana*		
Primer pairs	**TN**	**NP**	**P%**	**TN**	**NP**	**P%**	**TN**	**NP**	**P%**	**TN**	**NP**	**P%**	**TN**	**NP**	**P%**
E-AAC/*M*-CAT	205	195	95.1	90	42	46.7	87	12	13.8	99	66	66.7	101	41	40.6
E-AAC/*M*-CTT	173	167	96.5	73	41	56.2	80	14	17.5	84	51	60.7	91	34	37.4
E-AAC/*M*-CTA	151	143	94.7	71	43	60.6	54	3	5.6	90	57	63.3	55	19	34.5
E-AAC/*M*-CAC	133	128	96.2	77	54	70.1	41	8	19.5	65	43	66.2	54	26	48.1
E-AAC/*M*-CAG	117	114	97.4	52	34	65.4	41	15	36.6	51	36	70.6	48	27	56.3
E-AGG/*M*-CTA	82	79	96.3	40	33	82.5	24	3	12.5	42	28	66.7	33	14	42.4
E-AGG/*M*-CAC	81	80	98.8	33	27	81.8	20	7	35.0	32	28	87.5	20	8	40.0
Mean	135	129	96.4	62	39	66.2	50	9	20.1	66	44	68.8	57	24	42.8
Total	942	906	96.2	436	274	62.8	347	62	17.9	463	309	66.7	402	169	42

TABLE 4. Minimum and maximum inter-specific values of Sokal and Michener's dissimilarities based on 942 AFLP markers.

	V. planifolia	*V. tahitensis*	*V. pompona*	*V. bahiana*
V. tahitensis	0.139 - 0.241			
V. pompona	0.304 - 0.373	0.316 - 0.391		
V. bahiana	0.249 - 0.387	0.262 - 0.318	0.322 - 0.386	
V. odorata	0.232 - 0.285	0.226 - 0.259	0.291 - 0.328	0.261 - 0.280

for each tree using the DARwin 5.0 software (Perrier *et al.*, 2003). R software for windows (version 2.5.1; (R Development Core Team, 2006), Vienna, Austria) was used for further analyses.

A2.3.4. Reproducibility

The seven primer pairs selected for the AFLP analysis (Table 3) gave clear and reproducible patterns. Two repeats of 25 accessions (Table 1) were included in the analysis in order to test AFLP reproducibility. Dissimilarities between pairs of repeats ranged from *D* = 0 to *D* = 0.0194. This maximum value represented a discrepancy of 13 bands over 285 bands and was attributed to misalignments by the GelCompar software. Therefore, the error rate of the AFLP analysis was estimated to a maximum of 4.56% and this was considered acceptable for genetic diversity analysis.

A2.4. Results

A2.4.1. Interspecific AFLP diversity

The number of amplified fragments on the whole sample studied (375 accessions plus 25 repeats) varied from 81 to 205 with an average of 135 fragments per primer pair (Table 3). The average percentage of polymorphism was 96.4% ranging from 94.7% for E-AAC/M-CTA to 98.8% for E-AGG/M-CAC primer pair.

The structure of the tree based on dissimilarities reflected species delimitations with high bootstraps (100% for *V. pompona*, *V. bahiana* and *V. tahitensis* and 80% for *V. planifolia*; Fig. 1). The species genetically closest to *V. planifolia* was *V. tahitensis* (*D* max = 0.241; Table 4), and *V. bahiana* and *V. pompona* were the most divergent species from *V. planifolia* (*D* max = 0.387 and 0.373 respectively; Table 4).

All the artificial hybrids studied had consistent positions with their known parental origin (Fig. 1). Hybrids 'Manitra Ampotony' HY0130 and HY0003 (PL x TA) were located in intermediate position between the two parental species *V. planifolia* (*D* = 0.079 and *D* = 0.074 respectively) and *V. tahitensis* (*D* = 0.104 and *D*

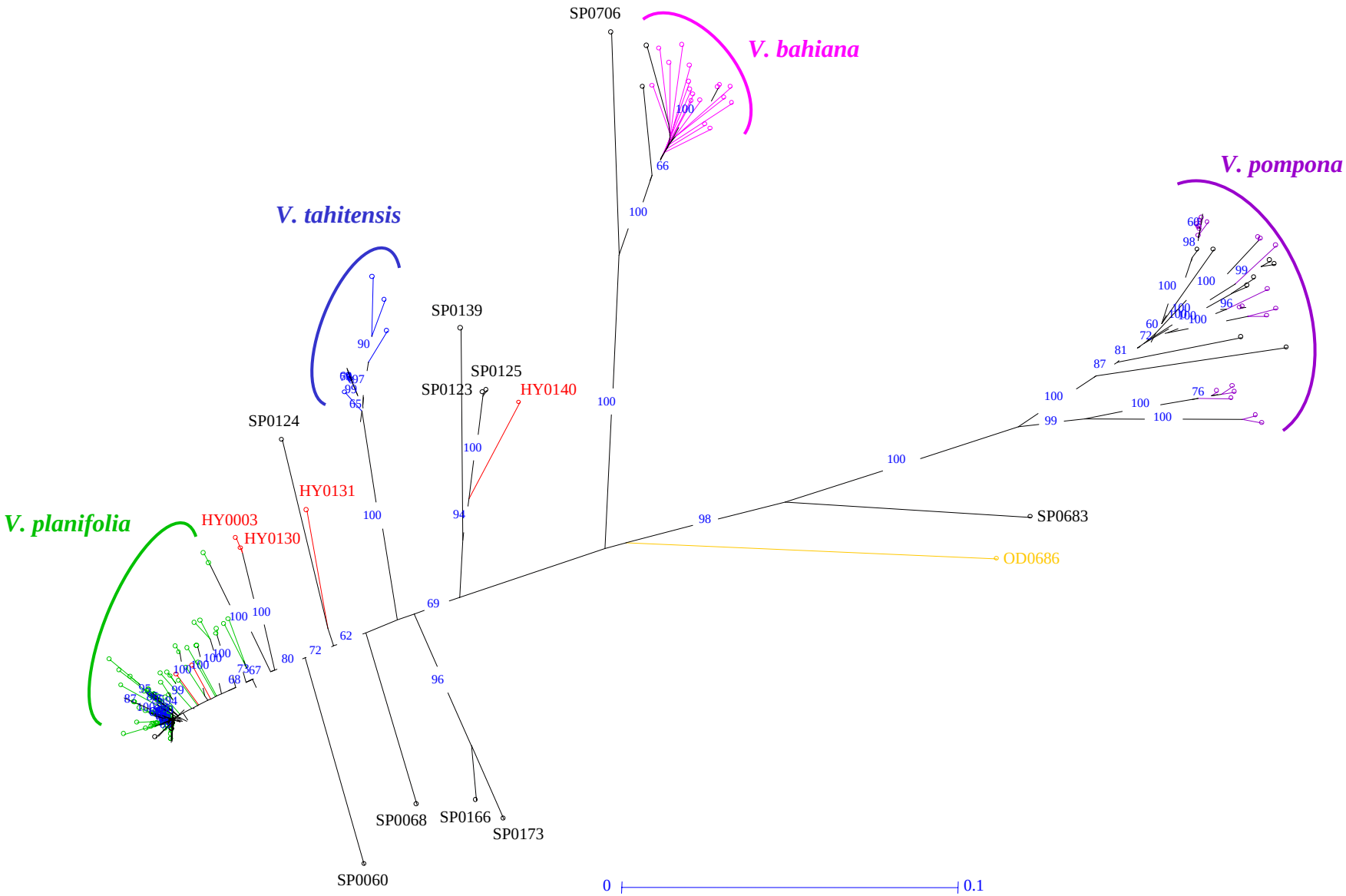


FIG. 1. The diversity of 375 *Vanilla* accessions based on NJ tree using the distance matrix of Sokal and Michener (1 000 bootstraps, bootstraps <60% not shown).

= 0.107 respectively); the back-cross hybrid HY0131 'Tsy Taitry' ((PL x PO) x PL) was closer to *V. planifolia* (*D* = 0.096) than to *V. pompona* (*D* = 0.291) as expected, and the three-way hybrid HY0140 ((PL x TA) x PO) was in intermediate position, closer to (PL x TA) hybrids (HY0130 and HY0003) (*D* = 0.185 and *D* = 0.183 respectively) than to the *V. pompona* species (*D* = 0.275).

Twenty-one unidentified accessions (SP) could be reclassified as *V. planifolia* (12 accessions), *V. pompona* (6 accessions), *V. bahiana* (2 accessions) and *V. tahitensis* (1 accession) according to their position in the AFLP tree. On the other hand, ten unidentified accessions also occupied unresolved positions (Fig. 1). Some were close to artificial interspecific hybrids, such as SP0139 or SP0123 and SP0125 which were linked to HY0140 with a bootstrap of 94%. Others were linked to species, such as SP0706 which was close to *V. bahiana*, or in intermediate positions between species: SP0124, SP0060, SP0068, SP0166, SP0173, SP0683 (Fig. 1).

A2.4.2. Intraspecific AFLP diversity

Intraspecific analyses were carried out separately for each species studied (including the newly identified SP specimens). This refined the analysis as more band levels are revealed in the interspecific analysis and this enhances the risk of misalignment.

V. planifolia – A total of 303 accessions were analyzed. The number of amplified fragments varied from 33 to 90 with an average of 62 fragments per primer pair (Table 3). The average percentage of polymorphism was 66.2% ranging from 46.7% for E-AAC/M-CAT to 82.5% for E-AGG/M-CTA primer pair. The global intraspecific *D* max value was 0.220. The large majority of the accessions (284) were placed in a group composed of 101 genotypes (one of these genotypes including 122 accessions) showing little variability (*D* mean = 0.011 and *D* max = 0.106) (Fig. 2). It gathered accessions from different geographical origins (Reunion Island, Madagascar, French Polynesia, French West Indies, Mexico) and of different phenotypes, from Reunion ('Classique', 'Mexique', 'Stérile', 'Grosse Vanille', 'Variegata') and from Mexico ('Mansa', 'Acamaya', 'Mestiza', one accession of 'Colibri'). Within these 101 *V. planifolia* genotypes, the relative frequencies of the 185 polymorphic bands (over 436 scored bands) were calculated (Fig. 3A) and this

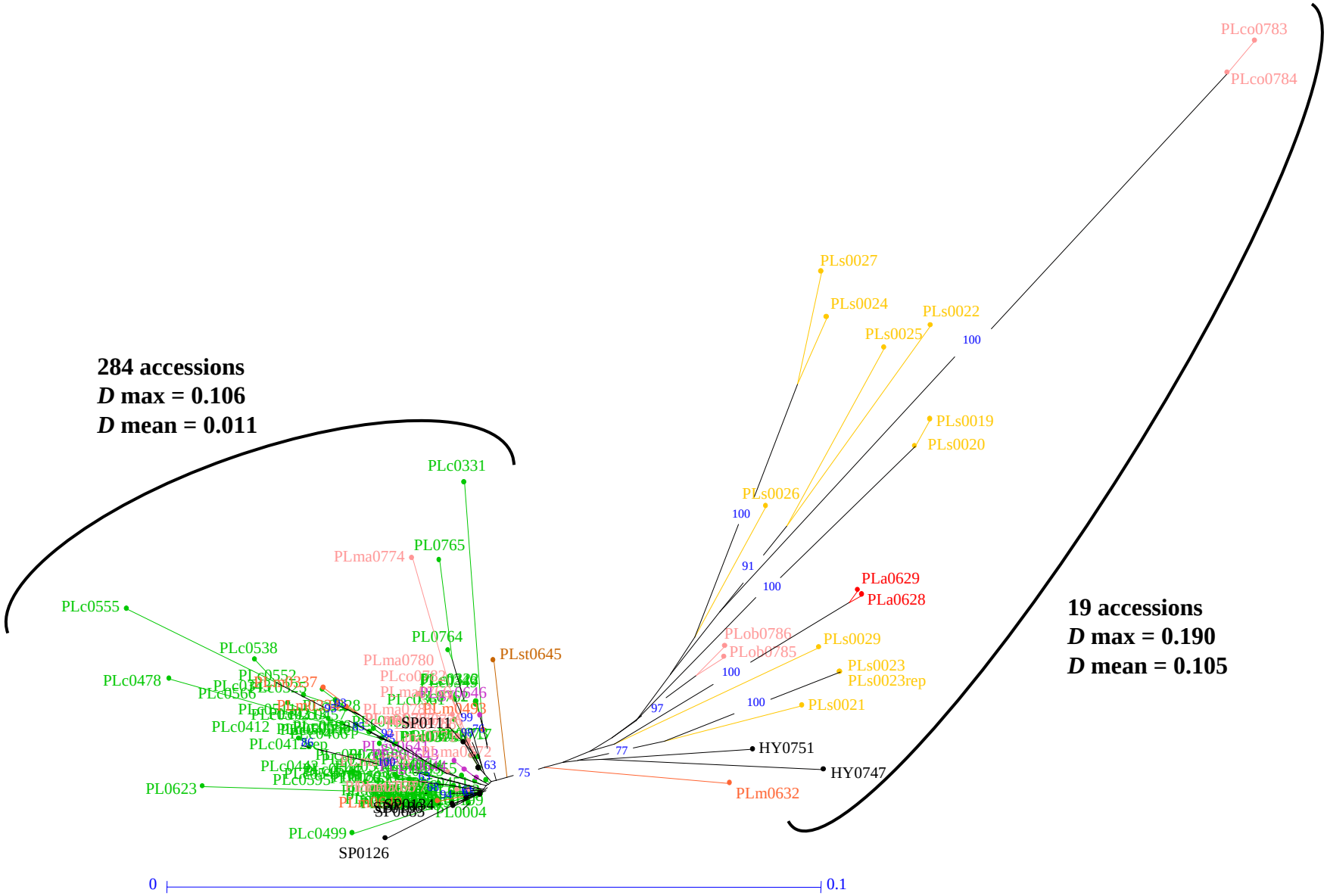


FIG. 2. Diversity structure of 303 *V. planifolia* accessions derived from NJ tree using the distance matrix of Sokal and Michener (1 000 bootstraps, bootstraps < 60% not shown). Within the group of 284 accessions, only the names of 101 genotypes are showed to improve clarity. (See Table 1 for accession code correspondences).

showed that the majority of the polymorphic bands (172) had frequencies in the extreme 0%-10% and 90%-100% ranges.

Beside this group, 19 unique genotypes could be found (*D* mean = 0.105 and *D* max = 0.190). These were the Mexican types 'Oreja de Burro' and 'Colibri' (two accessions), the ten self-progenies of 'Classique', two self-progenies of 'Tsy Taitry' and the two 'Aiguille' types from Reunion Island. Self-progenies of 'Classique' showed a strong pattern of segregating bands and showed a higher AFLP diversity (*D* max = 0.140) than the main group (*D* max = 0.106). The relative frequencies of the 95 polymorphic bands (over 322 scored bands) were assessed in these self-progenies (Fig. 3B) and this showed that the majority of the polymorphic bands (80) have frequencies around 75% (60% to 90% classes). As these polymorphic bands obviously represent segregating heterozygous loci, this corresponded to an observed heterozygoty level in *V. planifolia* Ho = 0.295.

Global *D* max values were 0.126 and 0.174, for *V. planifolia* accessions cultivated in Reunion Island (without self-progenies) and Mexico, respectively.

V. tahitensis – A total of 12 accessions were analyzed. The number of amplified fragments varied from 20 to 87 with an average of 50 fragments per primer pair (Table 3). The average percentage of polymorphism was 20.1% ranging from 5.6% for E-AAC/M-CTA to 36.6% for E-AAC/M-CAG primer pair. The intraspecific *D* max value was 0.161. The NJ tree was structured by a main group made of seven genetically identical accessions (*D* = 0) and one very close accession (*D* = 0.003) as well as four diverging accessions (0.08 < *D* < 0.161) (data not shown[1]). There was no apparent relationship between the genetic profiles and the phenotypes ('Haapape', 'Rea Rea', 'Parahurahu' and 'Tahiti'). The relative frequencies of polymorphic bands in *V. tahitensis* could not be calculated due to the small sample size (6 genotypes).

V. pompona – A total of 27 accessions were analyzed. The number of amplified fragments varied from 32 to 99 with an average of 66 fragments per primer pair (Table 3). The average percentage of polymorphism was 68.8% ranging from 60.7% for E-AAC/M-CTT to 87.5% for E-AGG/M-CAC primer pair. The intraspecific *D* max value was 0.340. Different groups with strong bootstrap values (100%) were revealed and can be put in relation with the geographical origin of the

[1] Annexe 3

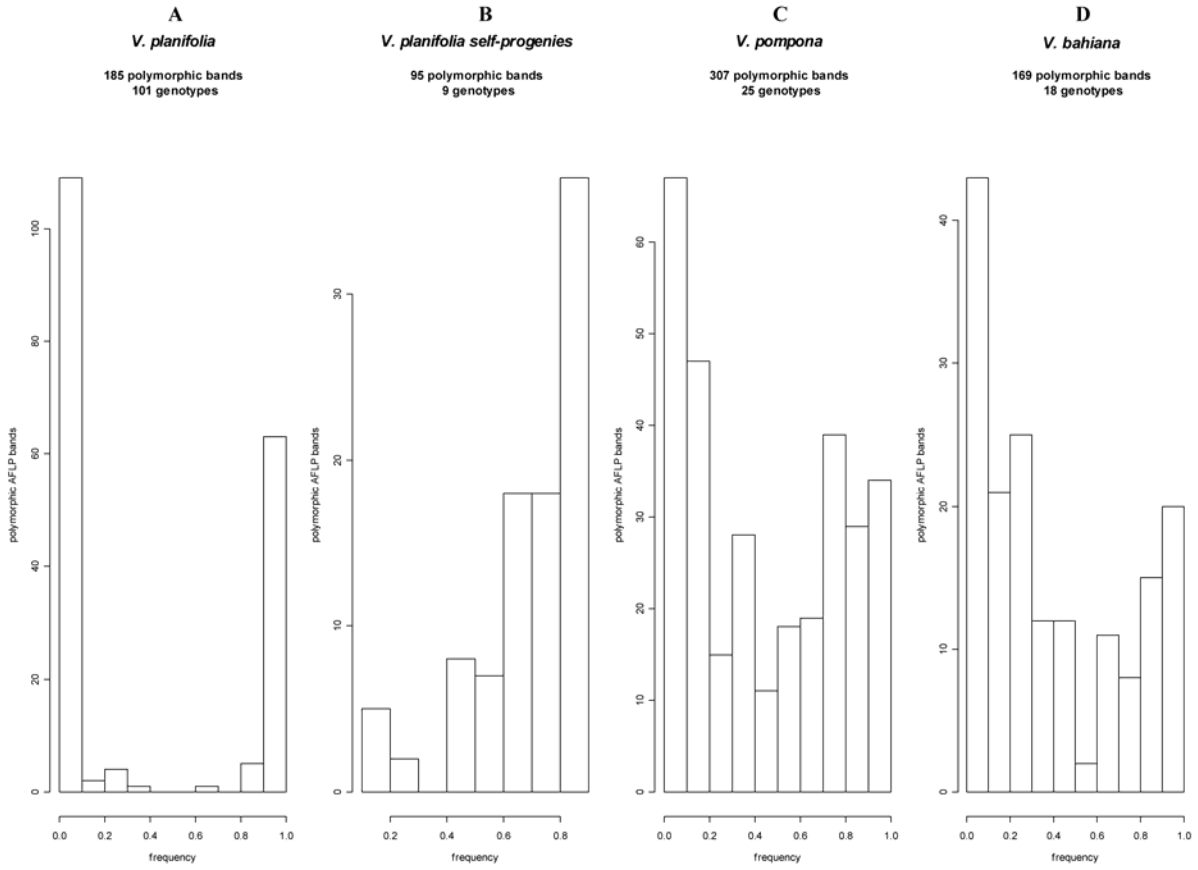


FIG. 3. Frequency distributions of polymorphic AFLP bands in *Vanilla* species: (A) *V. planifolia*, (B) *V. planifolia* self-progenies, (C) *V. pompona*, (D) *V. bahiana*.

spontaneous accessions collected in *V. pompona*'s area of natural dispersion (Guadeloupe, French Guyana, Brazil and other American origins; Fig. 4). Some accessions from French Polynesia (PO0018 and PO0160) and from unknown origin (PO0064, PO0691, PO0152) were also clearly differentiated from the others with a bootstrap of 100%. Accessions introduced in Reunion Island and French Polynesia were clearly differentiated from one another, and from the spontaneous accessions (Fig. 4). Within the 25 *V. pompona* genotypes, the relative frequencies of polymorphic bands (307 over 463) were calculated (Fig. 3C). Approximately one third of the polymorphic bands (101) were distributed like for *V. planifolia* within the extreme 10% presence/absence frequencies but the remaining two thirds (206) were also found in the intermediate 10 to 90% frequency range.

V. bahiana – 18 accessions were analyzed. The number of amplified fragments varied from 20 to 101 with an average of 57 fragments per primer pair (Table 3). The average percentage of polymorphism was 42.8% ranging from 34.5% for E-AAC/M-CTA to 56.3% for E-AAC/M-CAG primer pair. The intraspecific *D* max value was 0.164. The radial representation of the NJ tree revealed no structure (data not shown[2]). Within the 18 *V. bahiana* genotypes, the relative frequencies of polymorphic bands (169 on 402 bands scored) were distributed similarly to that of *V. pompona* (Fig. 3D), with approximately one third of the polymorphic bands (63) within the extreme 10% presence/absence frequencies.

A2.5. Discussion

A2.5.1. Patterns of introduction of **V. planifolia** in Reunion Island

The vast majority (284 over 303) of the *V. planifolia* accessions studied here were grouped with very low levels of genetic diversity. This group included different phenotypes: Mexican types ('Mansa', 'Mestiza', 'Acamaya', 'Vainilla', one accession of 'Colibri'), types from Reunion Island ('Classique', 'Mexique', 'Grosse Vanille', 'Stérile', 'Variegata') and accessions from other introduction and cultivation areas (Madagascar, West Indies, French Polynesia). The Mexican cultivated clones from Veracruz studied here were only slightly more variable (*D*

[2] Annexe 4

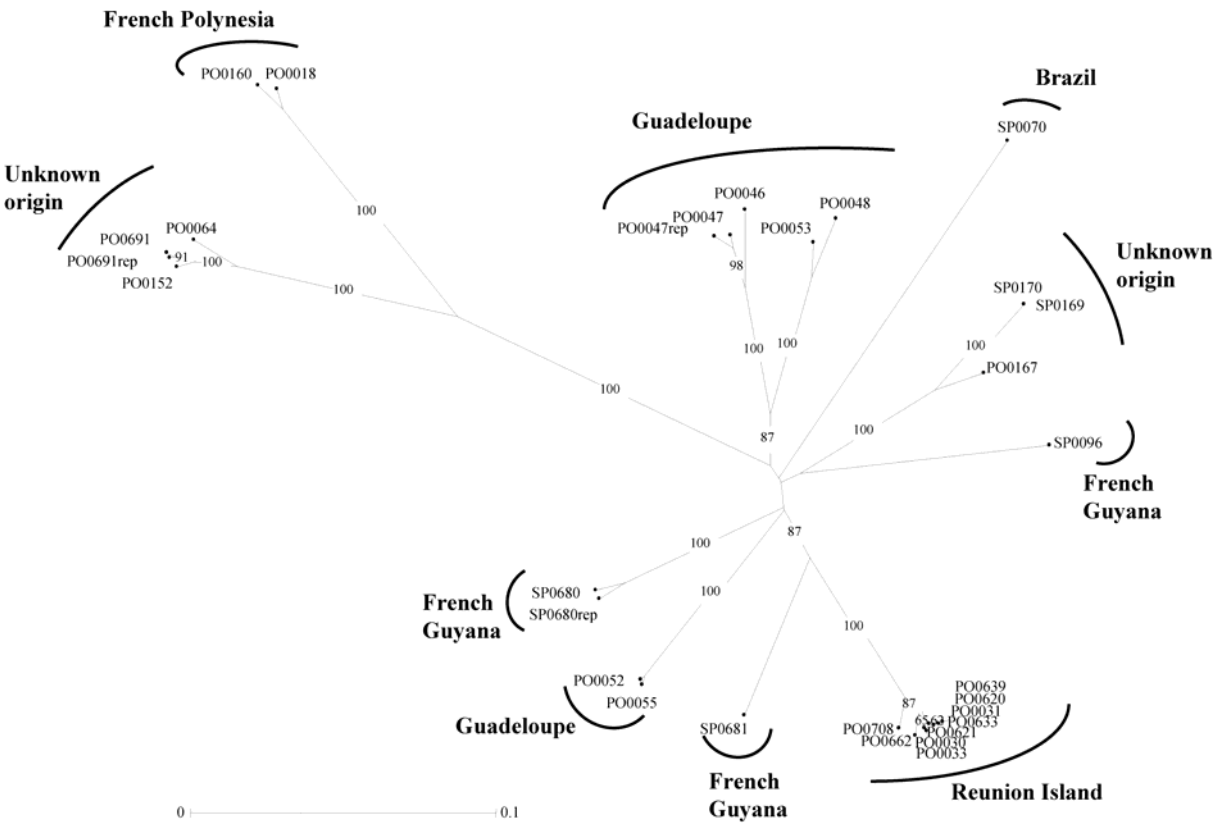


FIG. 4. Diversity structure of 27 *V. pompona* accessions derived from NJ tree using the distance matrix of Sokal and Michener (1 000 bootstraps, bootstraps < 60% not shown).

max = 0.174) than those cultivated in Reunion Island (*D* max = 0.126). Mexican vanilla plantations generally consist of plants obtained from a very small number of original clones (Schlüter, 2002), and the supposedly spontaneous accessions from Costa Rica, Guatemala and Central America studied are obviously escaped from cultivation (Soto Arenas, 2003). This close genetic affinity of Mexican cultivars to Indian Ocean (as well as French Polynesia and West Indies) cultivars suggests that the same clone is propagated in commercial production in these regions.

'Mansa' is the most widespread cultivated type in Mexico. The genetic similarity between 'Mansa' and the other *V. planifolia* cultivated accessions is in accordance with the hypothesis that 'Mansa' was probably the clone introduced in the Indian Ocean, Asia and Africa (Soto Arenas, 2003). This clone could correspond to the specimen that was introduced, early in the 19th century, by Marquis of Blandford into the collection of C. Greville at Paddington, from where it would have been disseminated worldwide (Correll, 1953; Bouriquet, 1954) via the botanical gardens of Paris and Antwerp (Belgium). From the present study, it can be concluded that most cultivated *V. planifolia* in the Indian Ocean (Reunion Island, Madagascar) and in other studied introduction areas (West Indies, French Polynesia) have evolved from a narrow genetic base via a single accession introduced (possibly 'Mansa').

A2.5.2. **V. pompona***: another case of a limited introduction event in Reunion Island*

Based on morphological observations, a few *V. pompona* specimens were suspected to be present in vanilla crops in Reunion Island (Table 1). This was confirmed by AFLP analysis showing that these accessions were indeed *V. pompona* (Fig. 4). Furthermore, they had extremely similar genotypes suggesting that there was a limited number of specimens introduced in Reunion Island (Fig. 4). In Reunion Island, the *V. pompona* specimens encountered in crops, may be the remaining specimens of the second documented introduction of vanilla in the island (Bory *et al.*, 2007) from Cayenne on June 27th 1819 by Commander Philibert and the botanist Perrotet. The specimen was described as a 'big vanilla' and was supposed to have disappeared (Bouriquet, 1954). It is therefore apparently still

present. Interestingly, *V. pompona* was also introduced in the EVT collection in French Polynesia and the introduced specimens in both areas were obviously different.

A2.5.3. Patterns of diversification of **V. planifolia** *in Reunion Island*

The low levels of genetic diversity revealed are consistent with the vegetative mode of propagation of *V. planifolia* crops. Despite the higher information level of the markers used, the lack of genetic diversity revealed using AFLP markers (*D* mean = 0.011 and *D* max = 0.106) is similar to the one that was obtained using RAPD where Besse *et al.* (2004) found very limited levels of intraspecific variation (*D* = 0.04) in cultivated *V. planifolia* ('Classique' and 'Mexique' types) in introduction areas. It is also similar to what was revealed for other cultivated species such as fig or clementine (Khadari *et al.*, 1995; Bretó *et al.*, 2001; Cabrita *et al.*, 2001) or introduced invasive species such as *Rubus alceifolius* (Amsellem *et al.*, 2000) following vegetative reproduction.

The present study also strongly suggests that *V. planifolia* specimens in Reunion Island have evolved through the accumulation of random point mutations through two centuries of vegetative propagation following a single accession introduced. AFLP pattern analysis in the group of 284 accessions witnesses the occurrence of point mutations: the variations revealed were due to the appearance or disappearance of fragments with frequencies below 10% (Fig. 3A). As a comparison, we have also studied self-progenies created by manual pollination in Reunion Island. These were characterized by a pattern of segregating bands compatible with a 75% presence/25% absence segregation ratio expected from heterozygous AFLP loci, as shown from polymorphic band distribution in Fig. 3B. This sexual reproduction enhances diversity levels (*D* max = 0.140).

Furthermore, we have also studied spontaneous American accessions of the species *V. bahiana* and *V. pompona* collected in the wild to see how genetic diversity was structured compared to a vegetatively propagated cultivated species such as *V. planifolia*. *V. bahiana* accessions showed no genetic structure and exhibited a *D* max value of 0.164. This could be related with the limited distribution area of *V. bahiana* in the North-East of Brazil (Pignal, 1994). On the

contrary, *V. pompona* showed the highest *D* max value (0.340) in the AFLP study, in accordance with its large area of distribution as described by Portères (1954) (Trinidad, South-East of Mexico, Nicaragua, Panama, Colombia, Venezuela, Ecuador, Bolivia, Brazil, French and Dutch Guyana, Paraguay, Martinique and Guadeloupe). The genetic structure showed well defined groups in accordance with the description of *V. pompona* as a species complex by Soto Arenas (2006b). Furthermore the frequency distribution of polymorphic bands was assessed in *V. pompona* and *V. bahiana* (Fig. 3C and 3D). This was compared to the patterns revealed for vegetatively propagated (Fig. 3A) and sexually propagated by selfing (Fig. 3B) *V. planifolia* accessions. It witnessed (i) accumulation of point mutations through vegetative reproduction (appearance or disappearance of AFLP bands with frequencies < 10%) and (ii) sexual reproduction (presence of numerous polymorphic bands in the 10% to 90% frequency range). This is consistent with the fact that spontaneous American *Vanilla* species evolve in the wild through a combination of vegetative and sexual reproduction, as reviewed in Bory *et al.* (2007).

This comparative analysis confirms that the pattern of diversification of *V. planifolia* in introduction areas such as Reunion Island is different from what exists for other species in areas of natural dispersion: they are solely due to the accumulation of somatic mutations through vegetative propagation.

Based on the AFLP patterns revealed, none of the phenotypes 'Classique', 'Mexique', 'Sterile', 'Grosse Vanille' and 'Variegata' in Reunion Island could be differentiated from one another (Fig. 2). The observed phenotypic variations are therefore not the result of an accumulation of somatic mutations. These phenotypes could be the result of dominant point mutations with pleiotropic effect (Krug et Carvalho, 1951; Manning *et al.*, 2006). Since we were unable to recover AFLP bands unique to any of these Indian Ocean phenotypes, such a proposition, if accurate, will be very difficult to test with AFLPs. Therefore the revealed mutations cannot explain the majority of the phenotypic diversity observed in Reunion Island. A similar pattern of diversification was observed for the other cultivated species *V. tahitensis* in French Polynesia, which was shown to be related to *V. planifolia* (Fig. 1): genetic similarities between *V. tahitensis* accessions were high (*D* max = 0.161) despite an obvious phenotypic variations in pod size and

shape, leaf length, intensity of flowering, maturity times and disease sensitivity levels (Portères, 1951).

There was only one notable exception. This study provided evidence that the phenotype 'Aiguille' from Reunion Island might result from a sexual event. Indeed, the type 'Aiguille' was genetically different from the majority of the *V. planifolia* accessions (Fig. 2). When 'Aiguille' is taken into account, *D* max value for *V. planifolia* Reunion Island goes from 0.106 to 0.126. Interestingly, the genetic variability of the *V. planifolia* self-progenies encompassed that of the 'Aiguille' type (Fig. 2). These observations support the possible rare intervention of sexual reproduction (selfing) in the diversification of types from Reunion Island. Some possibilities for a sexual reproduction of *Vanilla* in Reunion Island have previously been discussed (Bory *et al.*, 2007) and these included the germination of a forgotten pod in a cultivation field (obtained through hand self-pollination or a possible pollination by the bird *Zosterops* (Zosteropidae)), followed by vegetative multiplication of a single successfully germinated seedling. The two 'Aiguille' accessions are indeed almost genetically identical (Fig. 2), showing that they obviously derived from each other by vegetative multiplication and subsequent point mutations. This could have given rise to an easily distinguishable 'Aiguille' type, which resembles the 'Classique' type although it has more slender leaves, thinner flower with a curved central sepal and thinner pods (Bory *et al.*, 2007). Such a sexual reproduction event would however be exceptional as it concerned only two accessions found in the same plot despite extensive prospecting made in Reunion Island. Within the limits of the sampling, the 'Aiguille' type from Reunion Island was not introduced from Mexico but this cannot be ruled out as Mexican samples included in this study represent only cultivated material from Veracruz, an area that is likewise nearly genetically uniform and poorly representative of total levels of diversity in Mexico (Lubinsky, 2007). Nevertheless, no mention was made by the owner of the plantation regarding a recent foreign introduction of plant material. Moreover, if this type had been introduced a long time ago, it would be expected to have been multiplied and spread in other plantations in the island. This is not the case and therefore strongly supports the hypothesis that the 'Aiguille' type occurred from sexual reproduction in Reunion Island.

A2.5.4. Perspectives for vanilla breeding

As in any organism, but especially one of economic importance, a level of genetic diversity approaching uniformity is clear and common cause for concern, particularly with regards to pathogen outbreaks. Nevertheless, there is considerable opportunity to diversify the stock of cultivated vanilla, as attested to by the prior successes of breeding efforts at forming interspecific hybrids (Delassus, 1960; Dequaire, 1976; FOFIFA, 1990), as well as the optimistic results of more recent attempts to cross *V. planifolia* with *Fusarium* resistant species like *V. aphylla* in India (Minoo *et al.*, 2006b). Since *V. planifolia* was demonstrated to be heterozygous, with seedlings coming from self-pollination showing a higher AFLP diversity (*D* max = 0.140) than the other group of 284 *V. planifolia* accessions (*D* max = 0.106), there exists as well a high potential to enlarge diversity (in terms of genetic combinations) through selfing alone.

A2.5.5. Conclusions

This paper answered major questions regarding the patterns of dissemination and diversification of *V. planifolia*. It also raised new questions and issues that will have to be further investigated.

Although this study suggested the possible (but rare) role of sexual reproduction (selfing) in the diversification of the 'Aiguille' type in Reunion Island, the remaining phenotypic variations observed in crops remain unresolved at this stage. The limited genetic variation revealed cannot distinguish between the main phenotypes 'Classique' (from Reunion Island) and 'Mansa' (from Mexico) and the other phenotypes ('Mexique', 'Sterile', 'Grosse Vanille' and 'Variegata' in Reunion Island or 'Mestiza', 'Acamaya' and 'Vainilla' in Mexico). Other possible explanations can be proposed to account for the phenotypic variations observed in a vegetatively propagated species. The yellow/white striped accessions 'Variegata' and 'Acamaya' may have resulted from a mutation giving deficient plastids in one or several layers of the foliar tissue and this will have to be specifically assessed particularly at the chloroplast DNA level. Phenotypes could also be the result of

epigenetic phenomena. Mechanisms of epigenetic origin were recently discovered through the use of MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) in numerous plant species where genetic diversity shown by classical molecular markers was very low when compared to the observed phenotypic diversity (Xiong *et al.*, 1999; Bretó *et al.*, 2001; Imazio *et al.*, 2002). This could also be the case for vanilla in introduction areas where the occurrence of phenotypic variation is not congruent with the observed low molecular diversity. Finally, recent work suggested preliminary evidence that the *V. tahitensis* cv. 'Haapape' could be a tetraploid (Duval *et al.*, 2006) and that similar variations of the ploidy level could exist in *V. planifolia* and be responsible for some of the phenotypic diversity observed. Both hypothesis (epigenetics and polyploidy) are currently being tested to further unravel patterns of diversification of *V. planifolia* in Reunion Island. Finally, despite the self-sterility trait shared between the Mexican 'Oreja de Burro' type (Castillo Martinez et Engleman, 1993; Soto Arenas, 2003) and the 'Stérile' type from Reunion Island, these accessions displayed very different genotypes. It will be necessary to find out if these two accessions are characterized by the same mechanism of self-sterility (self-incompatibility, male sterility, or other mechanism). If it is the case, this self-sterility has evolved independently in Mexico and Reunion Island from different genotypes.

Some accessions remained unidentified at this stage and occupied intermediate positions between *V. planifolia, V. bahiana, V. pompona*, and *V. odorata*. These could represent other American *Vanilla* species not sampled in this study, or interspecific hybrids. *Vanilla* is indeed notable for providing one of the few cases in which natural hybridization in Neotropical orchids has been reported (Lubinsky *et al.*, 2006). This was demonstrated between *V. claviculata* (W. Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb.f in the Puerto Rico region (Nielsen et Siegismund, 1999; Nielsen, 2000), and suggested for other American sympatric species (Lubinsky, 2004). All this strongly suggests that there is a crucial need for co-dominant markers for the *Vanilla* genus, such as microsatellite markers, which would be of great help to resolve possible interspecific hybridization events. Such events are essential to study, as they could explain the apparent difficulties in

providing a correct revision of the taxonomy of the *Vanilla* genus (Soto Arenas, 1999b, 2003).

Acknowledgements

This study was supported by the Bureau des Ressources Génétiques (AP 2003-2004), the Conseil Régional of Reunion Island and the European Social Fund (Allocation Régionale de Formation Doctorale to Séverine Bory 2004-2007) and an NSF graduate research fellowship and UC-MEXUS doctoral grant awarded to Pesach Lubinsky. The authors thank all partners who have provided biological material, particularly M. Wong and S. Andrzejewski (Etablissement Vanille de Tahiti, French Polynesia), M. Pignal (Museum National d'Histoire Naturelle, Paris), P. Bertaux (Jardin du Luxembourg, Sénat, Paris), D. Scherberich (Parc de la Tête d'Or, Lyon), L. Bray (Serres d'Auteuil, Paris), C. Figureau (Jardin des Plantes, Nantes), E. Spick (Jardin des Plantes, Montpellier), P. Malaxechevarria (Royal Botanical Garden, Kew), P. Martin (FFAO), P. Fontaine (Jardin des Parfums et des Epices, Réunion), B. Côme (Coopérative Provanille, Réunion); and all producers from Reunion Island (P. Ah-Nieme, P. Boyer, B. Dijoux, L. Edmond, J. Ethève, J.B. Grondin, A. Hoareau, J.J. Lusinier, M. Padre, M. Plante, G.A. Poulbassia, M. Roulof, R. Sautron, K. Técher, Association Les Béliers), Madagascar (Biolandes, E. Marinot, F. Maurice, G. Ramnandraibe, J. Ranjamanoro), Guadeloupe (E. Mianney, Mr Nelson), French Guyana (J.L. Pradon), Martinique (F. Gallay), Brazil (C. Fikenscher, S. Gutfreund), Fiji (V. Tuia) and Papua New Guinea (Y. Adell). The authors thank Dr F. Chiroleu (CIRAD) and Dr X. Perrier (CIRAD) for their advices in data analyses as well as Pr M. Dron (IBP, Univ. Paris XI) and Dr P. Feldmann (CIRAD) for their interest and support to this work.

Article N°3 :

Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: polymorphism and transferability to other *Vanilla* species

Séverine BORY - Denis DA-SILVA - Ange-Marie RISTERUCCI - Michel GRISONI - Pascale BESSE - Marie-France DUVAL

Publié dans :

Scientia Horticulturae, **115** : 420-425

Mots clés : *Vanilla*, Orchidaceae, microsatellite, transférabilité

Résumé

Les sources de vanille naturelle sont les fruits préparés de deux orchidées obligatoirement pollinisées à la main et propagées par voie végétative : la 'Vanille Bourbon/mexicaine' (*Vanilla planifolia* G. Jackson) et la 'Vanille de Tahiti' (*V. tahitensis* J.W. Moore). Dans cet article, nous décrivons pour la première fois l'isolement et la caractérisation de quatorze loci microsatellites chez *V. planifolia*. Ces loci sont monomorphes à l'intérieur des accessions cultivées, comme attendu de cette espèce cultivée d'origine probablement clonale et comme l'ont montré les précédentes études génétiques. Ces marqueurs sont transférables à *V. tahitensis* et 11 loci sont polymorphes entre ces deux espèces génétiquement proches. De plus, certains marqueurs sont transférables et polymorphes parmi 15 autres espèces sauvages américaines, africaines et asiatiques et révèlent des relations solides entre les espèces, ainsi qu'un fort schéma de différenciation *Ancien Monde* vs *Nouveau Monde* dans le genre. Ces microsatellites seront très utiles pour les études de diversité, d'hybridation et de phylogéographie dans le genre *Vanilla*.

Author's personal copy

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Scientia Horticulturae 115 (2008) 420–425
SCIENTIA HORTICULTURAE
www.elsevier.com/locate/scihorti

Short communication

Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other vanilla species

S. Bory [a,b], D. Da Silva [b], A.-M. Risterucci [c], M. Grisoni [a], P. Besse [b,*], M.-F. Duval [d]

[a] CIRAD, UMR C53 PVBMT Cirad - Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France
[b] Université de La Réunion, UMR C53 PVBMT Cirad - Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis Messag Cedex 9, La Réunion, France
[c] CIRAD, UMR DAP, Avenue Agropolis, TA A-96/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France
[d] CIRAD, UPR Multiplication Végétative, Boulevard de la Lironde, TA A-75/02, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Received 10 July 2007; received in revised form 16 October 2007; accepted 17 October 2007

Abstract

The sources of natural vanilla are the cured fruits of two obligatorily hand-pollinated and clonally propagated orchids: 'Bourbon/Mexican vanilla' (*Vanilla planifolia* G. Jackson) and 'Tahitian vanilla' (*Vanilla tahitensis* J.W. Moore). In this paper we describe for the first time the isolation and characterization of 14 microsatellite loci from *V. planifolia*. These were monomorphic within cultivated accessions, as expected from the probable single clonal origin of this crop and previous genetic studies. These markers were transferable to *V. tahitensis* and 11 loci were polymorphic between these two closely related species. Furthermore, some of these markers were transferable and polymorphic across 15 other wild American, African and Asian species and revealed consistent relationships between species, together with a strong pattern of Old World versus New World differentiation in the genus. These microsatellites will be very useful for diversity, hybridization and phylogeographic studies in the genus *Vanilla*.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Vanilla*; Orchidaceae; Microsatellite; Transferability

1. Introduction

The genus *Vanilla* (Orchidaceae) contains 110 species (Portères, 1954) although this is under revision (Bory et al., 2007). *Vanilla planifolia* G. Jackson is the main cultivated species for its fragrant cured fruits (pods) and probably originates from eastern Mexico tropical forests (Soto Arenas, 1999). The second cultivated species is *Vanilla tahitensis* J.W. Moore (Bory et al., 2007). Vanilla crop consists of vegetatively propagated vines and manual auto-pollination must be performed to obtain pods (Bory et al., 2007). *V. planifolia* is severely threatened in its area of origin by habitat destruction (Soto Arenas, 2003). Other species of the genus represent valuable sources of useful traits for the improvement of *V. planifolia* with regards to disease resistance, self-pollination, or aromatic quality (Soto Arenas, 2003; Minoo et al., 2006; Bory et al., 2007). This is why there are currently numerous efforts worldwide to protect and characterize vanilla biodiversity (Bory et al., 2007; Grisoni et al., 2007). Iso-enzymatic (Cibrian Jaramillo, 1999; Nielsen and Siegismund, 1999; Soto Arenas, 1999; Nielsen, 2000), random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers (Schlüter, 2002; Besse et al., 2004; Minoo et al., 2006), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers (Duval et al., 2006) have already been used for diversity studies in *Vanilla* species. Microsatellite markers were developed for *V. planifolia* to refine the level of polymorphism detected at the intra-specific level, which was found to be very low using other markers (Cibrian Jaramillo, 1999; Soto Arenas, 1999; Schlüter, 2002; Besse et al., 2004; Duval et al., 2006). Microsatellites are indeed recommended as co-dominant

* Corresponding author. Tel.: +33 262 262938196; fax: +33 262 262938119.
E-mail address: Pascale.Besse@univ-reunion.fr (P. Besse).

0304-4238/$ – see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.scienta.2007.10.020

Author's personal copy

markers of choice for intra- and inter-population variation studies in orchids, because they are highly polymorphic, locus specific and require small amounts of DNA (Gustafsson, 2000; Soliva et al., 2000; Fay and Krauss, 2003). Furthermore, microsatellite transferability was assessed in other species of the genus to determine whether these markers could be useful to resolve other issues such as the occurrence of natural inter-specific hybridizations (Nielsen and Siegismund, 1999; Nielsen, 2000) and the patterns of phylogeographic differentiation of the genus.

2. Materials and methods

Microsatellite loci for *V. planifolia* were isolated from a genomic library enriched for di-nucleotides CT/GT constructed following the protocol of Billote et al. (1999). Total DNA was extracted from fresh leaves of *V. planifolia* using the MATAB protocol (Risterucci et al., 2000) and purified on anion-exchange microcolumns. Ten micrograms of extracted DNA were digested with *Rsa*I. Restriction fragments were ligated with *Rsa* adaptators (*Rsa*21: 5′-CTCTTGCTTACGCGTG-GACTA-3′; *Rsa*25: 5′-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAG-CACA-3′) and amplified. Microsatellite sequences were selected using biotin-labelled microsatellite oligoprobe and streptavidin-coated magnetic beads. The selected fragments were then amplified and cloned into pGEM-T vector (Promega) and transformed into Epicurian Coli XL1-Blue MRF' super-competent cells (Stratagene). A total of 176 recombinant colonies were PCR-amplified for 35 cycles using *Rsa*21 primer. PCR products were transferred onto nylon membranes (Hybond N+, Amersham) and screened for microsatellites with ^{32}P radiolabelled synthetic microsatellite probes. Ninety percent of the PCR products, i.e. 153 inserts were found positive and sequenced. Primers were designed for 49 loci. A preliminary PCR amplification test was performed and 14 primers were selected (Table 1). PCR reactions were carried out in 25 μl, containing 25 ng DNA, PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 U Taq DNA polymerase (RedGoldStar, Eurogentec) and 0.2 μM of each primer. The forward primer was labelled with a fluorescent 6-FAM dye. PCR reactions were performed on a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler using the following parameters: an initial step of 4 min at 94 °C, 34 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 60–53 °C (annealing temperature was lowered by 0.7 °C during the 10 first cycles), 1 min at 72 °C and a final step of 5 min at 72 °C. Amplified products were observed after running on a ABI prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) for the *V. planifolia*/*V. tahitensis* analysis. Amplified products were run on 2% agarose gel (Tris–borate–EDTA buffer) for the transferability analysis. Band alignment was completed using the GelCompar*II* software, 3.5 version (Applied Maths). Bands were coded for presence (1) or absence (0), and both modalities were given

Table 1
Primer sequences of 14 microsatellite loci in the *Vanilla* orchid (F for forward primer (labelled) and R for reverse primer)

SSR locus	Primer sequences (5′–3′)	Repeat motif	Clone size (bp)	Annealing, *T* (°C)	GenBank accession no.
mVplCIR002	F: TGGATGTGCATTTGTG; R: CGCATTCATTCACTTGT	(TG)8	222	60–53	EF486644
mVplCIR003	F: TATAGATGCACACGAGC; R: TCACATCCCTACATGC	(CA)7	349	60–53	EF486645
mVplCIR005	F: TTTGCTTGAACGTATGTC; R: GCAAACATAGAAATGCAC	(TG)6 Nx (TG)7 Nx (TG)6	259	60–53	EF486646
mVplCIR010	F: GCACATAAATACCTTACACC; R: GTTCACGTCAGTGTGCT	(CA)7 Nx (CA)6 Nx (CA)10	346	60–53	EF486647
mVplCIR015	F: AGTGTCTTTGTGTGCCT; R: TAGATAGTAAACCCATACTCAC	(TG)9	280	60–53	EF486648
mVplCIR016	F: TATGTGTGAGAGGGTGC; R: CAATTAGTCACATCCATAAAC	(TG)9	320	60–53	EF486649
mVplCIR019	F: AAGTGCCCAATCTATC; R: TGGATTCACCATGAC	(TG)9	222	60–53	EF486650
mVplCIR022	F: CAAAACACAAGGAAATGC; R: TGCAAGCCCACAAGT	(CA)9	197	60–53	EF486651
mVplCIR025	F: GTGTAGCGGTTCATACAA; R: CATTCATGGAAGTGGAG	(TG)8	231	63–55	EF486652
mVplCIR026	F: GCACATACATGCTTATTG; R: CATGTTCTTATTTGAGTGG	(CA)9	223	63–55	EF486653
mVplCIR028	F: AACATGCACAAGAAAG; R: TTTATGCACCTTGTTAG	(CA)9	190	60–53	EF486654
mVplCIR031	F: ATTTCCTCCCTCACTGTA; R: AATCTCAGGTGCTATTGG	(TG)9	346	60–53	EF486655
mVplCIR047	F: CATGCTTACATCTTTGTGTT; R: TAATGGACATGCACACTC	(GT)6 Nx (TG)7	301	63–55	EF486656
mVplCIR050	F: CTATGTGCGCTTTGG; R: CACTCAAGAACATGCAAC	(TG)7	224	63–55	EF486657

Repeat motif and size in number of base pairs refers to the alleles of the sequenced clones. Annealing temperature for PCR and GenBank accession numbers are also given.

Author's personal copy

Table 2
Transferability test for the 14 microsatellite loci on 17 *Vanilla* species

Vanilla species	Accession code	Section[a]	Sub-section[b]	Origin of species	Microsatellite loci													
					3	10	16	26	28	2	50	22	15	5	19	47	25	31
Approximate size range (bp) (agarose)					330–350	350	320	200–220	180–190	220	220–320	150–210	280–550	250–350	200–230	280–350	220–235	300–400
Vanilla albida	CR0058	F	L	Asia													X	X
Vanilla imperialis	CR0104	F	P	Africa													X	X
Vanilla roscheri	CR0061	A		Africa													X	X
Vanilla crenulata	CR0065	F	L	Africa													X	X
Vanilla aphylla	CR0145	A		Asia													X	X
Vanilla madagascariensis	CR0141	A		Africa													X	X
Vanilla phalaenopsis	CR0146	A		Africa													X	X
Vanilla humblotii	CR0179	A		Africa													X	X
Approximate number of alleles in Asian/African species (agarose)																	1	4
Vanilla palmarum	CR0083	F	M	America											X	X	X	X
Vanilla leprieuri	CR0109	F	L	America						X					X	X	X	X
Vanilla ensifolia	CR0174	F	L	America											X	X	X	X
Vanilla chamissonis	CR0702	F	L	America									X	X	X	X	X	X
Vanilla bahiana	CR0071	F	L	America								X		X	X	X	X	X
Vanilla pompona	CR0046	F	L	America							X	X	X	X	X	X	X	X
Vanilla odorata	CR0686	F	L	America							X		X	X	X	X	X	X
Vanilla tahitensis	CR0163	F	L	America	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vanilla planifolia	CR0577	F	L	America	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Approximate number of alleles in American species (agarose)					2	1	2	3	2	1	2	4	4	4	3	5	3	3
Approximate total number of alleles (agarose)					2	1	2	3	2	1	2	4	4	4	3	5	4	7

Accession code in the collection of *Vanilla* genetic resources from CIRAD, St-Pierre, La Réunion, France (Grisoni et al., 2007), section, sub-section and the continent of origin of species according to Portères (1954) are also given.

[a] Sections according to Portères (1954)—F: Foliosae section; A: Aphyllae section.

[b] Foliosae sub-sections according to Portères (1954)—L: Lamellosae; P: Papilloseae; M: Membranaceae.

Author's personal copy

equal weight to calculate Sokal and Michener dissimilarity indices (d_{i-j}) between pairs of accessions (Sokal and Michener, 1958): $d_{i-j} = (n_{11} + n_{00})/(n_{11} + n_{01} + n_{10} + n_{00})$, with n_{11} the number of fragments present in both i and j, n_{01} and n_{10} the number of fragments present in one accession but absent in the other, and n_{00} the number of fragments absent in both i and j. From the distance matrix obtained, an unweighted Neighbor-Joining tree (Saitou and Nei, 1987) was computed using the Darwin 5.0 software (Perrier et al., 2003) and branches robustness were tested using 1000 bootstraps.

3. Results

As observed in other orchid species (Soliva et al., 2000; Gustafsson and Thorén, 2001; Pellegrino et al., 2001; Kuo et al., 2005; Lin et al., 2005), microsatellite markers development in *Vanilla* was difficult with only 14 useful markers out of 153 positive clones. In our study, the fragments sequenced consisted of complex motifs including one or two small di-nucleotide repeats (from 6 to 10 repeats) and several short stretches (from 2 to 5 di-nucleotides) of the same microsatellite motif, as also reported in honeybees (Rowe et al., 1997) and in field bean (Koblízková et al., 1998). Moreover, flanking sequences were scattered with the same short stretches, which made difficult the design of specific primers and resulted in partial amplification, smears or parasite bands, as reported for lepidopteran species (Ji et al., 2003; Zhang, 2004).

Nevertheless, 14 primer pairs were successfully isolated and used to assess the intra- and inter-specific polymorphism within a sample of cultivated *Vanilla* including 7 *V. tahitensis* and 61 *V. planifolia* accessions. These were representative of the genetic diversity in these species as revealed from an AFLP analysis (Duval et al., 2006). An artificial hybrid between these two species was used to verify the consistency of the patterns. Three microsatellites (mVplCIR002, 010, 015) presented a monomorphic homozygous pattern for all accessions. The remaining 11 microsatellites were monomorphic within but polymorphic between species. Of these, eight (mVplCIR003, 005, 016, 019, 028, 031, 047, 050) showed homozygous patterns; two (mVplCIR025, 026) showed a heterozygous pattern (A1A2) in *V. planifolia* and homozygous (A2A2) in *V. tahitensis*. One microsatellite (mVplCIR022) presented a specific pattern with two bands for *V. tahitensis* (A4A5), three bands (A1A2A3) for *V. planifolia* and (A3A4A5) for the hybrid, that could be explained by a duplicated locus. Patterns were always consistent in the hybrid with complete additivity when parental species patterns were homozygous (except for mVplCIR047 where only the *V. tahitensis* alleles were transmitted). With all primers excluding the complex mVplCIR022, heterozygoty values observed were Ho = 0.154 for *V. planifolia* and Ho = 0 for *V. tahitensis*.

Finally, the 14 microsatellites were tested on a sample of 15 additional wild and cultivated *Vanilla* species representative of the genus diversity (Portères, 1954) to assess their transferability. Five primers were only applicable to *V. planifolia* and *V. tahitensis*, while the remaining nine were transferable (to a variable extent) and polymorphic across American species (Table 2). Two of these nine microsatellites (mVplCIR025 and mVplCIR031 shown in Fig. 1) were also transferable to wild African and Asian *Vanilla* species. Data obtained from the 14 loci were computed with mis-amplifications scored as null alleles. The Neighbor-Joining tree (Fig. 2) revealed a differentiation between American species on one hand, and species with an African-Asian origin on the other hand with a high bootstrap (88%). *Vanilla palmarum* was clearly separated from the other American species with a bootstrap of 78%. The species *V. planifolia* and *V. tahitensis* were closely related (bootstrap of 92%) and sister to other American species such as *Vanilla pompona*, *Vanilla odorata* or *Vanilla bahiana*.

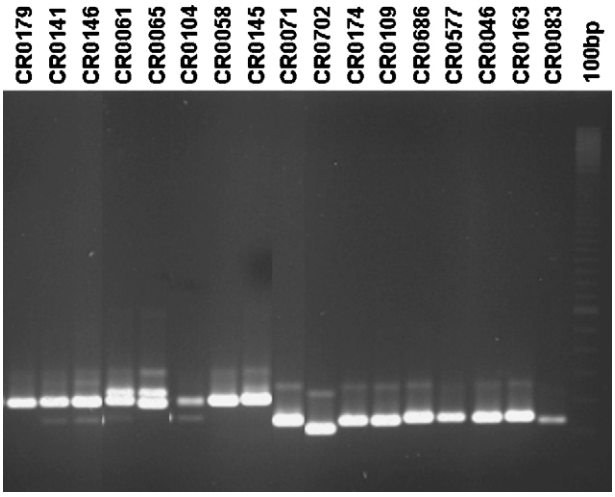


Fig. 1. Transferability of mVplCIR031 across *Vanilla* species revealed on a 2% agarose gel. Accessions are as described in Table 2. Size marker is the 100 bp ladder (most intense band at 800 bp).

4. Discussion

The 14 microsatellite markers were monomorphic within the *V. planifolia* accessions studied. This lack of intra-specific diversity is consistent with similar low levels reported using RAPD (Besse et al., 2004) and AFLP (Duval et al., 2006) analysis. Most of the samples surveyed are cultivated specimens (particularly from Reunion Island-Indian Ocean), and there is more and more evidence showing that cultivated *V. planifolia* may have a single clonal origin (Duval et al., 2006; Minoo et al., 2007). These markers should however be very useful to assess diversity levels in wild *V. planifolia* populations in Meso-America (Soto Arenas, 1999). Furthermore, using microsatellites allowed the first molecular based estimation of heterozygoty levels in this species which was not possible using dominant markers such as AFLP or RAPD. The Ho value (0.154) is congruent with the low Ho values reported (0–0.078) in *V. planifolia* populations using 15 allozyme loci (Soto Arenas, 1999) although slightly superior in accordance with the known higher levels of polymorphism and heterozygoty usually found for microsatellites (Powell et al., 1996; Santoni et al., 2000).

Author's personal copy

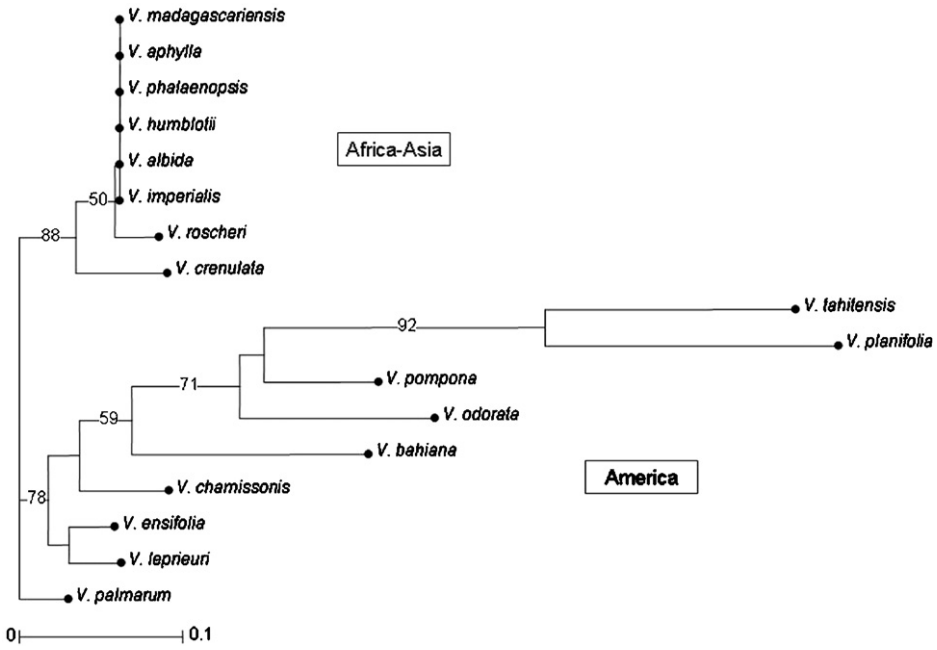


Fig. 2. Neighbor-Joining tree obtained from the Sokal and Michener indices for the 14 microsatellite loci in American, Asian and African *Vanilla* species. Bootstrap values >50% are indicated.

Neighbor-Joining relationships revealed between American species were consistent with those known from other types of markers (Soto Arenas, 2003; Besse et al., 2004; Duval et al., 2006). *V. palmarum* was described as an early diverging species from the other American species (Soto Arenas, 2003) and this was confirmed by the microsatellite analysis. Relationships between American species, particularly *V. planifolia*, *V. tahitensis*, *V. bahiana* and *V. pompona*, are congruent with what was revealed using AFLP markers (Duval et al., 2006). Furthermore, this analysis revealed a strong pattern of New World versus Old World phylogeographic differentiation in the *Vanilla* genus confirming morphological observations (Portères, 1954) and *rbc*L-based phylogeny (Soto Arenas, 2003). The consistency of the tree with previous results shows the interest of scoring mis-amplified microsatellite alleles as null alleles as their presence or absence is a reflection of species relatedness.

As these microsatellites are also markers of choice to detect hybridization, as demonstrated by the artificial hybrid study, they will be essential tools to answer major questions regarding the evolution of the genus. Of particular interest is the origin of *V. tahitensis* which is still enigmatic. Historically, it was introduced into Tahiti from the Philippines by Amiral Hamelin in 1848 (Correll, 1953; Portères, 1954). However, the genetic identity of this species is unclear. Some authors suggested it was *V. planifolia*, others that *V. tahitensis* might be the result from inter-specific hybridization between *V. planifolia* and a second parent, either a specimen of a *V. pompona*–*V. odorata* complex (Portères, 1951; Soto Arenas, 1999) or *V. pompona* (Portères, 1954). This hypothesis was based upon morphological traits shared either with *V. planifolia*, *V. pompona*, or *V. odorata* (Bory et al., 2007). Previous molecular studies did not validate the suggested inter-specific hybrid origin of *V. tahitensis* and favored the hypothesis of a variation of *V. planifolia* (Schlüter, 2002; Besse et al., 2004; Duval et al., 2006). The present analysis revealed that the surveyed *V. tahitensis* accessions were homozygous for the 14 microsatellite loci. Higher levels of heterozygoty would be expected from a first generation inter-specific hybrid. This issue is currently being investigated further. Preliminary results using mVplCIR031, 025 and 019 on an ABI prism sequencer (data not shown) revealed specific alleles for *V. pompona* and *V. odorata*, but none of these were found in *V. tahitensis*. Therefore, within the limits of our species sampling, the present study favors, again, a *V. planifolia* parentage for *V. tahitensis*.

The developed loci represent the first set of molecular co-dominant markers for *V. planifolia*, which will be very useful to further assess the levels of genetic diversity in cultivated and wild *V. planifolia*, as well as in the other cultivated species *V. tahitensis*. Due to their transferability, some of these markers will also contribute to appraise *Vanilla* genus evolution.

Acknowledgements

This study was supported by the Bureau des Ressources Génétiques (AP 2003-2004), the Conseil Régional of Reunion Island and the European Social Fund (Allocation Régionale de Formation Doctorale to Séverine Bory 2004–2007).

References

Besse, P., Da Silva, D., Bory, S., Grisoni, M., Le Bellec, F., Duval, M.-F., 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. Plant Sci. 167, 379–385.

Billote, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci, A.M., Baurens, F.C., 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits 54, 277–288.

Author's personal copy

Bory, S., Grisoni, M., Duval, M.-F., Besse, P., 2007. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. Genet. Resour. Crop Evol. doi:10.1007/s10722-10007-19260-10723.

Cibrian Jaramillo, A., 1999. Variacion genética de *Vanilla planifolia* en México. Ph.D. Dissertation. México City.

Correll, D.S., 1953. Vanilla, botany, history, cultivation and economic importance. Econ. Bot. 7, 291–358.

Duval, M.-F., Bory, S., Andrzejewski, S., Grisoni, M., Besse, P., Causse, S., Charon, C., Dron, M., Odoux, E., Wong, M., 2006. Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. Les Actes du BRG 6, 181–196.

Fay, M.F., Krauss, S.L., 2003. Orchid conservation genetics in the molecular age. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb, P.J. (Eds.), Orchid Conservation. Natural History Publications, Borneo, pp. 91–112.

Grisoni, M., Moles, M., Besse, P., Bory, S., Duval, M.-F., Kahane, R., 2007. Towards an international plant collection to maintain and characterize the endangered genetic resources of vanilla. Acta Hortic. (ISHS) 760, 83–91., In: http://www.actahort.org/books/760/760_769.htm.

Gustafsson, S., 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. Mol. Ecol. 9, 1863–1872.

Gustafsson, S., Thorén, P.A., 2001. Microsatellite loci in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. Mol. Ecol. Notes 1, 81–82.

Ji, Y.-J., Zhang, D.-X., Hewitt, G.M., Kang, L., Li, D.-M., 2003. Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. Mol. Ecol. Notes 3, 102–104.

Koblízková, A., Dolezel, J., Macas, J., 1998. Subtraction with 3′ modified oligonucleotides eliminates amplification artifacts in DNA libraries enriched for microsatellites. Biotechniques 25, 32–38.

Kuo, Y.-L., Chen, T.-C., Huang, M.-C., Wu, W.-L., 2005. Microsatellite marker development and analysis in *Dendrobium* species (Orchidaceae). In: Poster Presented at the 18th World Orchid Conference, Dijon, France.

Lin, T.-C., Chen, T.-C., Huang, M.-D., Huang, M.-C., Lee, S.-Y., Wu, W.-L., 2005. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Phalaenopsis* species and cultivars. In: Poster Presented at the 18th World Orchid Conference, Dijon, France.

Minoo, D., Nirmal Babu, K., Ravindran, P.N., Peter, K.V., 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. Sci. Hortic. 108, 414–422.

Minoo, D., Jayakumar, V.N., Veena, S.S., Vimala, J., Basha, A., Saji, K.V., Nirmal Babu, K., Peter, K.V., 2007. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expresses by RAPD polymorphism. Genet. Resour. Crop Evol. doi:10.1007/s10722-007-9252-3.

Nielsen, R.L., 2000. Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W.Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. Bot. J. Linn. Soc. 133, 285–302.

Nielsen, R.L., Siegismund, H.R., 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). Heredity 83, 560–567.

Pellegrino, G., Cafasso, D., Widmer, A., Soliva, M., Musacchio, A., Cozzolino, S., 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci from the orchid *Serapias vomeracea* (Orchidaceae) and cross-priming to other *Serapias* species. Mol. Ecol. Notes 1, 279–280.

Perrier, X., Flori, A., Bonnot, F., 2003. Data analysis methods. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J.C. (Eds.), Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants. Enfield, Science Publishers, Montpellier, pp. 43–76.

Portères, R., 1951. Observations sur le Vanillier de Tahiti. Bulletin de la Société Botanique de France 98, 126–127.

Portères, R., 1954. In: Lechevalier, P. (Ed.), Le genre *Vanilla* et ses espèces. Le vanillier et la vanille dans le monde, Paris, pp. 94–290.

Powell, W., Machray, G.C., Provan, J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci. 1, 215–222.

Risterucci, A.M., Grivet, L., N'Goran, J.A.K., Pieretti, I., Flament, M.H., Lanaud, C., 2000. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theor. Appl. Genet. 101, 948–955.

Rowe, D.J., Rinderer, T.E., Stelzer, J.A., Oldroyd, B.P., Crozier, R.H., 1997. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees (*Apis mellifera*). Insect. Soc. 44, 85–93.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.

Santoni, S., Faivre-Rampart, P., Prado, E., Prat, D., 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Cahier d'études et de recherches francophones/Agricultures 9, 311–327.

Schlüter, P.M., 2002. RAPD variation in *Vanilla planifolia* Jackson (Orchidaceae) and assessment of the putative hybrid *Vanilla tahitensis* Moore. MBiochem Thesis. University of Oxford, Oxford, p. 55.

Sokal, R.R., Michener, C.D., 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 28, 1409–1438.

Soliva, M., Gautschi, B., Salzmann, C., Tenzer, I., Widmer, A., 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. Mol. Ecol. 9, 2178.

Soto Arenas, M.A., 1999. Filogeografia y recursos genéticos de las vainillas de México. Project J101. CONABIO, México.

Soto Arenas, M.A., 2003. Vanilla. In: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., Rasmussen, F.N. (Eds.), Genera Orchidacearum: Orchidoideae. Oxford University Press, USA, pp. 321–334.

Zhang, D.-X., 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. Trends Ecol. Evol. 19, 507–509.

II. Apport complémentaire des microsatellites pour l'analyse génétique

II.1. Introduction

Les microsatellites sont des marqueurs codominants de choix pour les études de variation intra et inter-populations chez les orchidées, car ils sont hautement polymorphes, locus-spécifiques et nécessitent seulement de petites quantités d'ADN (Gustafsson, 2000; Soliva *et al.*, 2000; Fay et Krauss, 2003). Ils sont relativement abondants et couvrent uniformément le génome (Powell *et al.*, 1996). Puisque les régions flanquantes des microsatellites sont suffisamment conservées, les amorces définies chez une espèce peuvent être utilisées chez les espèces génétiquement proches (Jarne et Lagoda, 1996; Santoni *et al.*, 2000). De nombreuses études ont utilisé les marqueurs microsatellites pour une identification variétale et pour l'analyse de la diversité génétique chez des espèces végétales cultivées telles que le manioc (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 1998), la patate douce polyploïde (Buteler *et al.*, 1999), la pèche (Aranzana *et al.*, 2002), la noix de coco (Merrow *et al.*, 2002), l'abricot (Romero *et al.*, 2003) ou la canne à sucre (Cordeiro *et al.*, 2003).

Grâce à la précédente analyse AFLP (Bory *et al.*, submitted-b), 21 accessions non identifiées (SP) ont pu être reclassées en *V. planifolia* (12 accessions), *V. pompona* (six accessions), *V. bahiana* (deux accessions) et *V. tahitensis* (une accession) en fonction de leur position dans l'arbre AFLP (Fig. 1 dans Bory *et al.* (submitted-b)). D'autre part, dix accessions non identifiées occupaient des positions non résolues. Certaines sont proches d'hybrides interspécifiques artificiels, telles que les accessions SP0139 ou SP0123 et SP0125 liées à l'hybride triple HY0140 [(PL x TA) x PO] avec un bootstrap de 94% (Bory *et al.*, submitted-b). D'autres accessions sont liées à des espèces, comme SP0706 qui se retrouve proche de *V. bahiana*, ou en position intermédiaire entre les espèces : SP0124, SP0060, SP0068, SP0166, SP0173, SP0683 (Fig. 1 dans Bory *et al.* (submitted-b)). Deux

Tableau 2.1 : Profils microsatellites obtenus pour les loci mVplCIR031et mVplCIR025, les tailles des allèles et leur spécificité par espèce sur un sous-échantillon de 64 accessions de *Vanilla*.

	Taille des allèles (pb)													
	mVplCIR031							mVplCIR025						
	339	341	343	345	347	380	392	224	226	228	229	230	233	235
Espèce-spécificité des allèles	BA	PO	TA	OD	PL			BA	PO	PO BA	PO OD	PL TA	PL	
V. bahiana (5 accessions)	X							X						
V. bahiana (2 accessions : BA0072 + BA0062)	X									X				
V. pompona (11 accessions: 30 46 48 167 170 621 639 662 680 681 708)		X									X			
V. pompona (3 accessions: 64 160 691)		X								X				
V. tahitensis (12 accessions)			X									X		
V. odorata + SP0683				X							X			
V. planifolia (11 accessions)					X							X	X	
V. planifolia (1 accession: PL0024 semis)					X							X		
PL x TA (HY0130 + HY0003)			X		X							X	X	
Tsy Taitry ((PL x PO) x PL) (HY0131)		X			X							X	X	
Tsy Taitry semis (2 accessions: HY0747 + HY0751)					X							X	X	
HY0140: ((PL x TA) x PO) + SP0123, SP0125		X			X								X	
SP0124, SP0139		X			X							X		
SP0706	X							X				X		
SP0070		X		X							X			
SP0096	X	X							X		X			
SP0060	X				X							X	X	
SP0166, SP0173	X											X		
SP0068	X	X				X	X							X

marqueurs SSR mVplCIR025 et mVplCIR031 développés précédemment pour *V. planifolia* et transférables aux espèces américaines proches (Bory *et al.*, 2008), et ayant montré des profils espèce-spécifiques, ont donc été utilisés sur un sous-échantillon de la collection pour préciser la position taxonomique de ces accessions non identifiées et détecter d'éventuelles hybridations.

Enfin, le marqueur mVplCIR031 étant transférable aux espèces africaines et asiatiques et ayant montré un profil de qualité, il a été utilisé sur toutes les espèces connues de la collection du CIRAD ainsi que sur des espèces non déterminées afin d'éclaircir leur position phylogéographique.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Matériel végétal

Pour affiner les résultats des AFLP obtenus précédemment (Bory *et al.*, submitted-b) à l'aide des deux loci SSR, un sous-échantillon de 64 accessions a été analysé. Il comprend les accessions indéterminées de l'étude AFLP, des hybrides ainsi que quelques représentants des cinq espèces *V. planifolia*, *V. pompona*, *V tahitensis*, *V. bahiana* et *V. odorata* (Tableau 2.1).

Pour l'étude phylogéographique avec le locus mVplCIR031 uniquement, 137 accessions ont été analysées. Ces accessions comprennent les 18 espèces de *Vanilla* disponibles en collection, des hybrides de parents connus (*V. planifolia* x *V. tahitensis*, (*V. planifolia* x *V. pompona*) x *V. planifolia*, (*V. planifolia* x *V. tahitensis*) x *V. pompona*) ainsi que des espèces non identifiées (Tableau 2.2).

Les échantillons ont été collectés à partir de lianes maintenues dans la collection des ressources génétiques du vanillier au CIRAD à La Réunion (Grisoni *et al.*, 2007). Cette collection rassemble des accessions obtenues grâce à des échanges avec des jardins botaniques, des collections privées ou collectées au cours de prospections. Les précisions pour chaque accession (espèce, provenance, et section taxonomique selon Portères (1954)) sont présentées dans le Tableau 2.2. Les accessions pour lesquelles le nom d'espèce était disponible et/ou les

Tableau 2.2 : Code, nom d'espèce, provenance et section taxonomique selon Portères (1954) des 137 accessions utilisées pour la phylogéographie avec le marqueur mVplCIR031. Les allèles américains sont en jaune et les allèles afro-asiatiques en orange.

Code	Espèce	Provenance	Section (Portères 1954)	Génotype au locus mVplCIR031			
HY0003	hybride (PL x TA)	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	343	347		
TA0017	*tahitensis*	Polynésie française (Raiatea)	Foliosae	343			
PL0024	*planifolia*	Réunion	Foliosae	347			
PO0030	*pompona*	Réunion (Ste-Rose) < Comores	Foliosae	341			
PO0046	*pompona*	Guadeloupe (Petit Bourg)	Foliosae	341			
PO0048	*pompona*	Guadeloupe (Petit Bourg)	Foliosae	341			
AL0058	*albida*	France (Paris)	Foliosae	401			
AL0059	*albida*	France (Paris)	Foliosae	401			
SP0060	sp.	France (Paris)	Foliosae	339	347		
BA0062	*bahiana*	France (Paris)	Foliosae	339			
TA0063	*tahitensis*	France (Paris)	Foliosae	343			
PO0064	*pompona*	France (Paris)	Foliosae	341			
CRE0065	*crenulata*	France (Paris)	Foliosae	388	392		
CRE0067	*crenulata*	Centrafrique	Foliosae	390	392		
SP0068	sp.	Costa Rica (Cahuita)	Foliosae	339	341	380	392
SP0069	sp.	Brésil (Alagoinhas)	Foliosae	341	345		
SP0070	sp.	Brésil (Catu)	Foliosae	341	345		
BA0071	*bahiana*	Brésil (Catu)	Foliosae	339			
BA0072	*bahiana*	Brésil (Bahia)	Foliosae	339			
SP0073	sp.	Brésil (Bahia)	Foliosae	339			
BA0075	*bahiana*	Brésil (Bahia)	Foliosae	339			
BA0076	*bahiana*	Brésil (Bahia)	Foliosae	339	347		
BA0077	*bahiana*	Brésil (Bahia)	Foliosae	339			
SP0079	sp.	Guadeloupe	Foliosae	341			
SP0081	sp.	France (Cherbourg)	Aphyllae	341			
SP0082	sp.	France (Cherbourg)	Foliosae	392			
PA0083	*palmarum*	Brésil (Bahia)	Foliosae	332			
SP0087	sp.	France (Cherbourg)	Foliosae	339			
SP0088	sp.	France (Cherbourg)	Aphyllae	398			
SP0089	sp.	France (Cherbourg)	Aphyllae	398			
PL0090	*planifolia*	Seychelles	Foliosae	347			
SP0091	sp.	Afrique	Foliosae	392			
PA0093	*palmarum*	Guyane française	Foliosae	339	341		
SP0095	sp.	France (Cherbourg)	Foliosae	341	345		
SP0096	sp.	Guyane française (Cayenne)	Foliosae	339	341		
SP0100	sp.	France (Cherbourg)	Foliosae	336			
SP0101	sp.	France (Cherbourg)	Aphyllae	398			
SP0102	sp.	Afrique	Foliosae	392			
AF0103	*africana*	Afrique	Foliosae	392			
IM0104	*imperialis*	Afrique	Foliosae	392			
IM0105	*imperialis*	Afrique	Foliosae	392			
SP0106	sp.	Afrique	Foliosae	392			

accessions identifiées sur la base d'observations morphologiques fournies par les producteurs ou les botanistes, ont été codées AF pour *V. africana*, AL pour *V. albida*, AP pour *V. aphylla*, BA pour *V. bahiana*, CH pour *V. chamissonis*, CRE pour *V. crenulata*, EN pour *V. ensifolia*, GR pour *V. grandiflora*, HU pour *V. humblotii*, IM pour *V. imperialis*, LE pour *V. leprieuri*, MA pour *V. madagascariensis*, OD pour *V. odorata*, PA pour *V. palmarum*, PH pour *V. phalaenopsis*, PL pour *V. planifolia*, PO pour *V. pompona*, TA pour *V. tahitensis* et HY pour les hybrides. Les accessions pour lesquelles l'identification était douteuse ou inconnue, soit quand les informations concernant l'espèce n'étaient pas disponibles, soit parce que la morphologie ne correspondait pas avec la description de l'espèce selon Portères (1954) ont été codées SP.

L'ADN a été extrait selon le protocole de Risterucci *et al.* (2000) et purifié sur des spin columns 100 (Sigma, St. Louis, Missouri). Les concentrations des extraits d'ADN ont été estimées visuellement par comparaison avec des dilutions d'échantillons d'ADN de maïs de concentration connue, après migration électrophorétique sur gels d'agarose.

II.2.2. Analyse microsatellite

Cette analyse a été réalisée avec deux paires d'amorces, développées chez *V. planifolia* (mVplCIR025: F-GTGTAGCGGTTCATACAA/R-CATTCATGGAAGTGGAG, GenBank accession n° EF486652 et mVplCIR031: F-ATTTCCTCCCTCACTGTA/R-AATCTCAGGTGCTAT TGG, GenBank accession n° EF486655) (Bory *et al.*, 2008). L'amplification des loci a été réalisée selon le protocole de Bory *et al.* (2008). Les profils SSR ont été obtenus avec un analyseur génétique ABI PRISM 3100. L'alignement des bandes a été réalisé avec le logiciel GelCompar *II*, version 3.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

AF0107	*africana*	Afrique	Foliosae	396	400
HU0108	*humblotii*	Grandes Comores	Aphyllae	396	400
LE0109	*leprieuri*	Guyane française	Foliosae	340	
SP0110	sp.	France (Cherbourg)	Foliosae	347	
PL0111	*planifolia*	France (Cherbourg)	Foliosae	347	
SP0112	sp.	Guyane française	Foliosae	341	
SP0113	sp.	Liberia	Foliosae	392	
SP0114	sp.	Paraguay	Foliosae	392	
SP0115	sp.	France (Cherbourg)	Foliosae	340	
SP0116	sp.	Guyane française	Foliosae	341	
SP0117	sp.	Guyane française	Foliosae	341	
SP0118	sp.	Guyane française	Foliosae	341	
SP0119	sp.	Guyane française	Foliosae	336	
SP0120	sp.	Guyane française	Foliosae	339	
SP0122	sp.	Guyane française	Foliosae	339	
SP0123	sp.	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	341	347
SP0124	sp.	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	341	347
SP0125	sp.	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	341	347
HY0127	hybride	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	341	347
TA0128	*tahitensis*	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	343	
HY0130	hybride (PL x TA)	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	343	347
HY0131	hybride (PL x PO) X PL	Madagascar (Antalaha)	Foliosae	341	347
SP0139	sp.	Madagascar (Vohemar)	Foliosae	341	347
HY0140	hybride (PL x TA) x PO	Madagascar (Vohemar)	Foliosae	341	347
MA0141	*madagascariensis*	Madagascar (Vohemar)	Aphyllae	398	
MA0142	*madagascariensis*	Madagascar (Vohemar)	Aphyllae	398	
AP0145	*aphylla*	Thaïlande	Aphyllae	404	
PH0146	*phalaenopsis*	France (Lyon)	Aphyllae	398	
SP0153	sp.	Guyane française	Foliosae	380	392
AL0154	*albida*	France (Lyon)	Foliosae	401	
SP0155	sp.	Guyane française	Foliosae	380	392
IM0156	*imperialis*	Cameroun	Foliosae	401	404
SP0157	sp.	République Dominicaine	Foliosae	347	
PO0160	*pompona*	Polynésie française (Papeete)	Foliosae	341	
HY0161	hybride (PLxTA)	Polynésie française (Papeete)	Foliosae	347	
TA0162	*tahitensis*	Polynésie française (Iles sous le Vent)	Foliosae	343	
TA0163	*tahitensis*	Polynésie française (Iles sous le Vent)	Foliosae	343	
TA0164	*tahitensis*	Polynésie française (Iles sous le Vent)	Foliosae	343	
TA0165	*tahitensis*	Polynésie française (Iles sous le Vent)	Foliosae	343	
SP0166	sp.	France (Montpellier) < Réunion	Foliosae	339	
PO0167	*pompona*	France (Cornebarieu)	Foliosae	341	
PO0170	*pompona*	France (Montpellier)	Foliosae	341	
SP0171	sp.	France (Montpellier)	Foliosae	336	
SP0172	sp.	France (Montpellier)	Foliosae	347	
SP0173	sp.	France (Montpellier)	Foliosae	339	
EN0174	*ensifolia*	Guyane	Foliosae	341	
SP0175	sp.	Cameroun	Foliosae	392	
SP0178	sp.	France (Nantes)	Foliosae	339	

II.3. Résultats

II.3.1. Précisions des résultats de l'analyse AFLP : identification des échantillons inconnus (SP)

Pour les 64 accessions analysées, les microsatellites ont amplifié un total de sept allèles pour mVplCIR031 et sept pour mVplCIR025 (Tableau 2.1). Sur la base des profils alléliques révélés pour les accessions identifiées appartenant aux espèces *V. planifolia, V. tahitensis, V. pompona, V. bahiana* et *V. odorata*, les allèles ont été assignés selon leur spécificité (dans la limite de l'échantillonnage étudié). Ils sont indiqués dans le Tableau 2.1.

Le locus mVplCIR031 est homozygote et monomorphe pour chacune des cinq espèces et présente des profils espèce-spécifiques : les allèles sont spécifiques à *V. bahiana* (339 pb), *V. pompona* (341 pb), *V. tahitensis* (343 pb), *V. odorata* (345 pb) et *V. planifolia* (347 pb).

Le locus mVplCIR025 révèle quelques allèles spécifiques : pour *V. bahiana* (224 pb), *V. pompona* (226 pb) et *V. planifolia* (233 pb). D'autres allèles sont partagés entre *V. pompona* et *V. bahiana* (228 pb), *V. pompona* et *V. odorata* (229 pb) et *V. planifolia* et *V. tahitensis* (230 pb).

Le locus mVplCIR025 est plus variable que mVplCIR031 au niveau intraspécifique : *V. bahiana* est polymorphe, homozygote pour l'allèle à 224 pb (cinq accessions), et pour l'allèle à 228 pb (deux accessions). *V. pompona* est homozygote pour l'allèle à 229 pb (onze accessions) et homozygote pour l'allèle à 228 pb (accessions PO0064, PO0160 et PO0691). Finalement, les accessions de *V. planifolia* testées sont hétérozygotes (230-233 pb) sauf pour l'accession PL0024 (issue de semis d'autofécondation) qui est homozygote pour l'allèle à 230 pb (Tableau 2.1).

Les accessions SP0070 et SP0096 qui étaient groupées avec *V. pompona* dans l'arbre AFLP (Fig. 4 dans Bory *et al.* (submitted-b)), présentent des profils originaux pour les deux loci microsatellites. SP0070 est hétérozygote pour mVplCIR031 avec des allèles spécifiques à *V. pompona* et à *V. odorata*, et homozygote pour mVplCIR025 avec un allèle partagé entre *V. pompona* et *V.*

HU0179	*humblotii*	Mayotte	Aphyllae	396	
TA0181	*tahitensis*	Polynésie française (Uturoa)	Foliosae	343	
TA0182	*tahitensis*	Polynésie française (Uturoa)	Foliosae	343	
TA0183	*tahitensis*	Polynésie française (Uturoa)	Foliosae	343	
TA0184	*tahitensis*	Papouasie Nouvelle-Guinée	Foliosae	343	
PL0331	*planifolia*	Réunion (Bras-Panon)	Foliosae	347	
PL0334	*planifolia*	Réunion (Bras-Panon)	Foliosae	347	
PL0412	*planifolia*	Réunion (Bras-Panon)	Foliosae	347	
PL0577	*planifolia*	Réunion (Bras-Panon)	Foliosae	347	
PO0621	*pompona*	Réunion (Ste-Rose) < Comores	Foliosae	341	
PL0623	*planifolia*	Réunion (Ste-Rose)	Foliosae	347	
PL0628	*planifolia*	Réunion (St-Philippe)	Foliosae	347	
PL0632	*planifolia*	Réunion (St-Philippe)	Foliosae	347	
PO0639	*pompona*	Réunion (St-André)	Foliosae	341	
PL0644	*planifolia*	Réunion (St-Philippe)	Foliosae	347	
PO0662	*pompona*	Réunion (Ste-Suzanne)	Foliosae	341	
SP0665	sp.	Guyane française	Foliosae	341	345
CH0666	*chamissonis*	Brésil (Sao Paulo)	Foliosae	314	
CH0667	*chamissonis*	Brésil (Sao Paulo)	Foliosae	314	
BA0668	*bahiana*	Brésil (Bahia)	Foliosae	339	
BA0671	*bahiana*	Brésil (Bahia)	Foliosae	339	
PO0680	*pompona*	Guyane (Combi)	Foliosae	341	
PO0681	*pompona*	Guyane (St-Elie)	Foliosae	341	
SP0682	sp.	Guyane (St-Elie)	Foliosae	334	
SP0683	sp.	Guyane (Combi)	Foliosae	345	
OD0686	*odorata*	France (Paris)	Foliosae	345	
PO0691	*pompona*	France (Paris)	Foliosae	341	
GR0693	*grandiflora*	Guyane	Foliosae	341	
MA0694	*madagascariensis*	France (Paris)	Aphyllae	398	
CRE0696	*crenulata*	France (Paris)	Foliosae	388	392
SP0697	sp.	Royaume-Uni (Kew)	Aphyllae	400	
SP0698	sp.	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	392	
SP0699	sp.	Royaume-Uni (Kew)	Aphyllae	398	
SP0700	sp.	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	339	
PL0701	*planifolia*	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	347	
CH0702	*chamissonis*	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	314	
TA0703	*tahitensis*	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	343	
SP0705	sp.	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	347	
SP0706	sp.	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	339	
SP0707	sp.	Royaume-Uni (Kew)	Foliosae	339	
PO0708	*pompona*	Réunion (St-Philippe)	Foliosae	341	
HY0747	hybride (semis autof HY0131)	Réunion/Madagascar	Foliosae	347	
HY0751	hybride (semis autof HY0131)	Réunion/Madagascar	Foliosae	347	
PL0774	*planifolia*	Mexique	Foliosae	347	
PL0783	*planifolia*	Mexique	Foliosae	347	
IM0796	*imperialis*	Danemark (Copenhague)	Foliosae	347	
IM0797	*imperialis*	Danemark (Copenhague)	Foliosae	341	347

odorata. SP0096 est hétérozygote pour mVplCIR031 avec des allèles spécifiques à *V. bahiana* et à *V. pompona* et pour mVplCIR025 avec un allèle spécifique à *V. pompona* et un allèle partagé entre *V. pompona* et *V. odorata* (Tableau 2.1).

L'analyse SSR montre que les hybrides artificiels ont des profils alléliques en accord avec leur origine parentale. Les hybrides HY0130 et HY0003 (PL x TA) sont hétérozygotes avec des allèles de *V. planifolia* et *V. tahitensis* ; HY0131 Tsy Taitry, [(PL x PO) x PL] a des allèles de *V. planifolia* et *V. pompona* ; les descendants d'autofécondation de Tsy Taitry ont des allèles détectés issus de *V. planifolia* uniquement. Finalement, HY0140 [(PL x TA) x PO] a des allèles de *V. pompona* et/ou de *V. planifolia* mais aucun allèle pour *V. tahitensis* n'est détecté. HY0140 présente des profils similaires à ceux de SP0123 et SP0125 provenant de Madagascar (Tableau 2.1) en accord avec les résultats AFLP (Bory *et al.*, submitted-b).

Les accessions SP0124 et SP0139 provenant de Madagascar ont des profils identiques, hétérozygotes pour mVplCIR031 avec des allèles spécifiques à *V. planifolia* et *V. pompona* et homozygotes pour mVplCIR025, avec un allèle partagé entre *V. planifolia* et *V. tahitensis* (Tableau 2.1).

L'accession SP0683 présente le même profil SSR que *V. odorata*. L'accession SP0706 est homozygote pour mVplCIR031 avec un allèle spécifique à *V. bahiana* et hétérozygote pour mVplCIR025 avec un allèle spécifique à *V. bahiana* et un allèle partagé entre *V. planifolia* et *V. tahitensis*. SP0060 est hétérozygote pour mVplCIR031 avec des allèles spécifiques à *V. bahiana* et *V. planifolia* et pour mVplCIR025 avec des allèles spécifiques à *V. planifolia* et un allèle partagé entre *V. planifolia* et *V. tahitensis*. Les accessions de Montpellier SP0166 et SP0173 présentent des profils identiques : homozygotes pour mVplCIR031 avec un allèle spécifique à *V. bahiana* et homozygotes pour mVplCIR025 avec un allèle partagé entre *V. planifolia* et *V. tahitensis.* Finalement, SP0068 présente un profil homozygote pour mVplCIR025 avec un allèle original à 235 pb. Pour mVplCIR031, il montre un profil à quatre allèles dont deux correspondent à des allèles de *V. bahiana* (339 pb) et *V. pompona* (341 pb) et les deux autres sont très différents (380 pb et 392 pb) (Tableau 2.1). Ces allèles particuliers ne correspondent pas aux allèles révélés chez les autres accessions étudiées mais sont des allèles spécifiques à des espèces de *Vanilla* d'origine asiatique ou africaine, comme nous le verrons

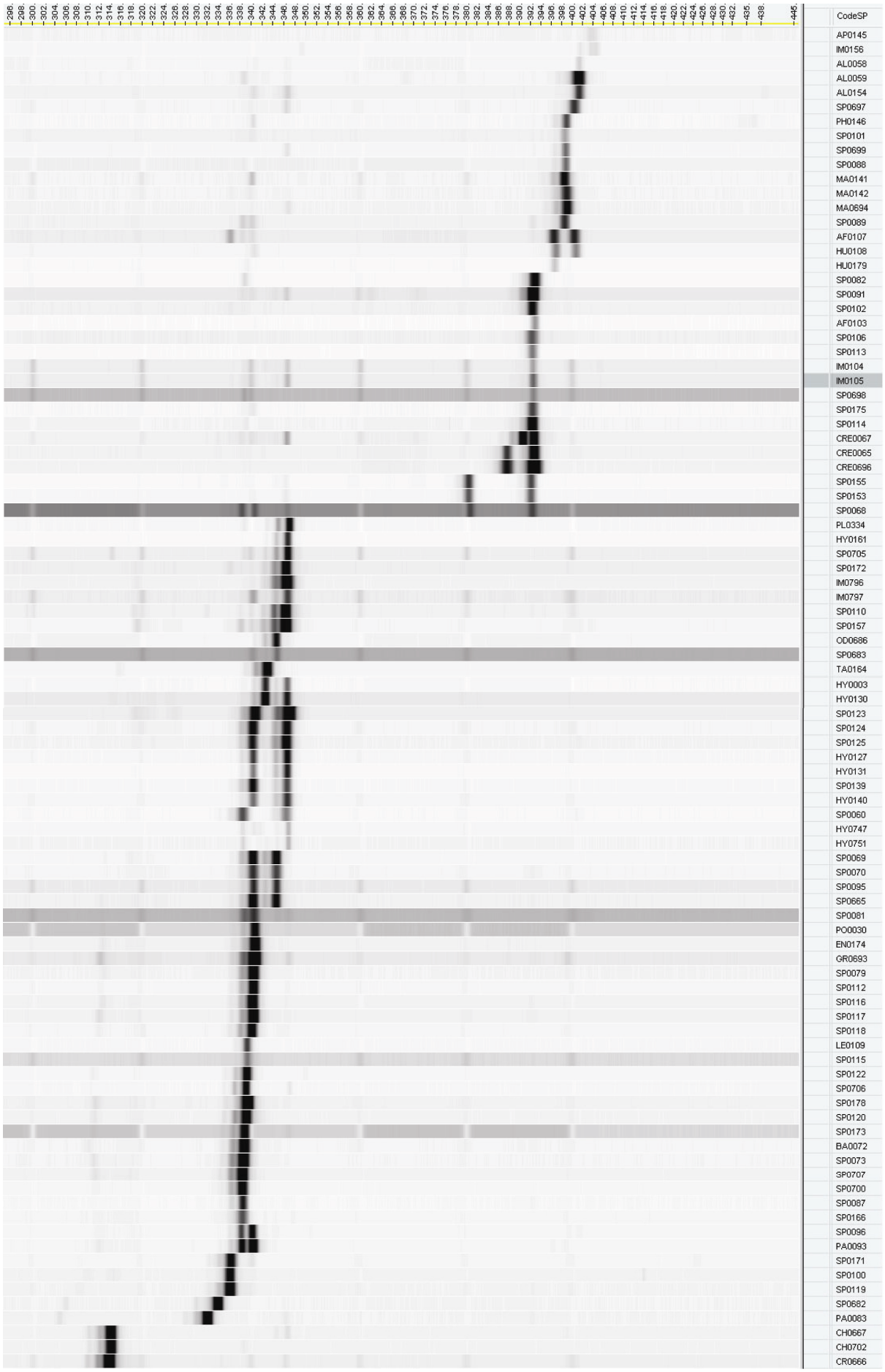


Figure 2.1 : Profil du microsatellite mVplCIR031 sur 137 accessions. Pour plus de clarté, une seule accession des espèces *V. planifolia*, *V. tahitensis*, *V. pompona* et *V. bahiana* a été représentée.

plus loin. Ce profil particulier a été confirmé avec quatre répétitions d'amplification PCR.

II.3.2. Intérêt du marqueur mVplCIR031 pour la phylogéographie

Pour les 137 accessions analysées, le microsatellite mVplCIR031 a amplifié un total de 18 allèles (Tableau 2.2, Figure 2.1). Il montre une excellente différenciation des espèces avec d'une part 103 accessions d'origine américaine amplifiant neuf allèles de 314 à 347 pb et d'autre part 33 accessions d'origines asiatique et africaine amplifiant neuf allèles de 380 à 404 pb. Seule l'accession SP0068 présente un profil particulier avec deux allèles afro-asiatiques et deux allèles américains.

Parmi les 103 accessions présentant un profil américain, les quatre espèces *V. planifolia*, *V. tahitensis*, *V. pompona* et *V. bahiana* sont monomorphes comme nous l'avons montré précédemment. Parmi les autres accessions américaines, les trois accessions de *V. chamissonis* CH0666, CH0667, CH0702 ont le même profil et l'allèle le plus grand de toutes les accessions testées. Les deux accessions de *V. palmarum* PA0083 du Brésil et PA0093 de Guyane française n'ont pas le même allèle. Une seule accession aphylle SP0081 (*V. cf. barbellata*), américaine, présente un profil américain.

Parmi les 33 accessions présentant un profil afro-asiatique, trois accessions de *V. albida* AL0058, AL0059 et AL0154 ont le même profil. Les deux accessions de *V. africana* AF0103 et AF0107 n'ont pas les mêmes allèles. Les trois accessions de *V. crenulata* CRE0067, CRE0065, CRE0696 sont hétérozygotes et un allèle diffère pour la CRE0067. Douze accessions aphylles présentent un profil afro-asiatique : *V. aphylla* AP0145 de Thaïlande ; *V. phalaenopsis* PH0146 ; *V. madagascariensis* MA0141, MA0142 et MA0694 de Madagascar ayant le même allèle ; *V. humblotii* HU0108 de Grandes Comores, hétérozygote et HU0179 de Mayotte, homozygote ; et 5 accessions non déterminées.

Certaines accessions posent question. Sur les cinq spécimens de *V. imperialis* espèce africaine, deux accessions IM0796 et IM0797 d'un jardin botanique montrent un profil américain alors que les trois autres présentent bien un profil afro-asiatique, IM0104 et IM0105 ayant les mêmes allèles et IM0156 étant hétérozygotes

avec des allèles différents. Cette différenciation entre les cinq accessions suggère un problème de détermination pour les deux accessions présentant le profil américain. Par ailleurs, les accessions SP0153 et SP0155 collectées en Guyane et SP0114 collectée au Paraguay présentent des allèles typiquement afro-asiatiques qui soulèvent un problème. Enfin, l'accession SP0068 collectée au Costa-Rica, présente des allèles américains et afro-asiatiques.

II.4. Discussion

II.4.1. Diversité intraspécifique

Les 12 accessions de *V. planifolia* présentent le même profil au locus mVplCIR031, ainsi qu'au locus mVplCIR025 à l'exception du semis d'autofécondation PL0024 dont les allèles ont ségrégé. Les 12 accessions de *V. tahitensis* sont monomorphes aux deux loci. Ces données confirment le faible polymorphisme rencontré dans la précédente étude microsatellite (Bory *et al.*, 2008). Les 14 accessions de *V. pompona* présentent le même profil monomorphe au locus mVplCIR031 et sont polymorphes avec deux allèles au locus mVplCIR025, d'une part les accessions PO0064, PO0691, PO0160 et d'autre part les 11 accessions restantes. Cette différenciation a été également observée par AFLP (Fig. 4 dans Bory *et al.* (submitted-b)) où les accessions PO0064 et PO0691 d'origine américaine inconnue et l'accession PO0160 introduite en Polynésie française étaient les plus distantes des autres *V. pompona*. Les sept accessions de *V. bahiana* sont monomorphes au locus mVplCIR031, mais polymorphes avec deux allèles au locus mVplCIR025, pour BA0062 et BA0072 d'une part et les cinq autres *V. bahiana* d'autre part. Ces données concernant *V. pompona* et *V. bahiana* sont nouvelles par rapport à l'étude microsatellite précédente (Bory *et al.*, 2008) où seulement une accession de chaque espèce avait été étudiée. La différenciation dans les profils révélés ici pour *V. pompona* et *V. bahiana* traduit leur diversité génétique plus importante comparé à *V. planifolia* et *V. tahitensis*, comme l'analyse AFLP l'a montré (Bory *et al.*, submitted-b).

II.4.2. Hybrides artificiels

Dans les années 1950-1980, des programmes de recherche sur l'hybridation ont été réalisés par l'IRAT (Institut de Recherches Agronomiques Tropicales) et l'IRAM (Institut de Recherches Agronomiques à Madagascar) à Antalaha (Madagascar) conduisant à la création avec succès d'hybrides interspécifiques (Delassus, 1960; Dequaire, 1976; FOFIFA, 1990) dont les origines parentales spécifiques ont été confirmées dans la présente étude ('Manitra Ampotony' HY0130 et HY0003: (PL x TA); 'Tsy Taitry' HY0131: [(PL x PO) x PL]; HY0140: [(PL x TA) x PO]).

Les accessions SP0123, SP0124, SP0125 et SP0139 proviennent de matériel échantillonné dans les collections de Madagascar. Dans l'analyse AFLP, SP0123 et SP0125 étaient liés à l'hybride connu HY0140 [(PL x TA) x PO] avec un fort bootstrap (94%) et SP0139 était proche d'eux (Fig. 1 dans Bory *et al.* (submitted-b)). Dans l'analyse SSR, SP0123 et SP0125 ressemblent à HY0140, et SP0124 et SP0139 sont identiques avec des allèles de *V. planifolia* et de *V. pompona*. Selon nos résultats et dans la limite de nos connaissances sur l'origine du matériel végétal, ces accessions sont probablement des hybrides artificiels 'échappés' de programmes de recherche plutôt que des hybrides naturels.

II.4.3. Mise en évidence du rôle de l'hybridation dans l'évolution du genre **Vanilla**

Cette étude SSR a permis de confirmer l'origine parentale de quelques accessions d'hybrides interspécifiques cultivés à Madagascar ('Manitra Ampotony', 'Tsy Taitry') ce qui témoigne de sa solidité pour résoudre des évènements d'hybridation naturelle.

Le genre *Vanilla* est un des rares genres parmi les orchidées néotropicales pour lequel des hybridations naturelles ont été rapportées (Lubinsky *et al.*, 2006). Ceci a été démontré entre *V. claviculata* et *V. barbellata* dans la région de Porto Rico (Nielsen et Siegismund, 1999; Nielsen, 2000), et suggéré pour d'autres espèces sympatriques, telles que *V. planifolia* et *V. pompona* ou *V. insignis*, vivant en sympatrie près de Papantla (Lubinsky, 2004). De plus, des hybridations

interspécifiques ont été réalisées avec succès dans différents programmes d'amélioration (Delassus, 1960; Dequaire, 1976; FOFIFA, 1990; Minoo *et al.*, 2006b) et n'ont pas montré l'existence de barrières reproductives majeures même entre des espèces de *Vanilla* distantes (Bory *et al.*, 2007).

L'accession SP0060 provenant du jardin botanique de Nantes, a des ressemblances morphologiques avec *V. planifolia* mais montrait des profils de bandes AFLP divergents des autres accessions de *V. planifolia*. Dans l'arbre NJ AFLP (Fig. 1 dans Bory *et al.* (submitted-b)), il était placé en position intermédiaire entre *V. planifolia* et *V. tahitensis*. Dans l'analyse SSR, SP0060 a des allèles spécifiques à *V. planifolia* (dont un commun à *V. tahitensis*) et *V. bahiana*. De façon similaire, l'accession SP0706 du jardin botanique de Cherbourg se retrouvait proche de *V. bahiana* dans l'analyse AFLP (Fig. 1 dans Bory *et al.* (submitted-b)) et présente des allèles microsatellites spécifiques à *V. bahiana* et *V. planifolia*. Enfin, les accessions SP0166 et SP0173 du jardin botanique de Montpellier ont des allèles microsatellites spécifiques à *V. planifolia* et *V. bahiana*. Dans la limite de la présente analyse, il peut être conclu que ces accessions (SP0060, SP0706, SP0166 et SP0173) pourraient représenter des hybrides entre *V. bahiana* et *V. planifolia*. Etant donné la position de quelques unes de ces accessions dans l'arbre AFLP (Fig. 1 dans Bory *et al.* (submitted-b)), SP0060 et SP0706 pourraient être des hybrides back-cross, respectivement du type [(PL x BA) x PL] et [(PL x BA) x BA]. Compte tenu du peu d'information sur l'origine de ces accessions, elles pourraient être des hybrides naturels ou des spécimens issus de programmes d'hybridation.

Quelques allèles *V. pompona* sont communs à *V. bahiana* et *V. odorata* montrant ainsi que *V. pompona* est une espèce génétiquement très diverse qui pourrait aussi comprendre des accessions d'origine ancienne hybride (*V. pompona* x *V. bahiana* pour SP0096 de Guyane française et *V. pompona* x *V. odorata* pour SP0070 du Brésil).

II.4.4. Accessions restantes non identifiées

L'accession spontanée de Guyane SP0683 est homozygote pour les deux loci SSR, avec un allèle spécifique à *V. odorata* à un locus, et un allèle partagé entre *V. odorata* et *V. pompona* à l'autre locus. Sur l'arbre NJ AFLP (Fig. 1 dans Bory *et al.*

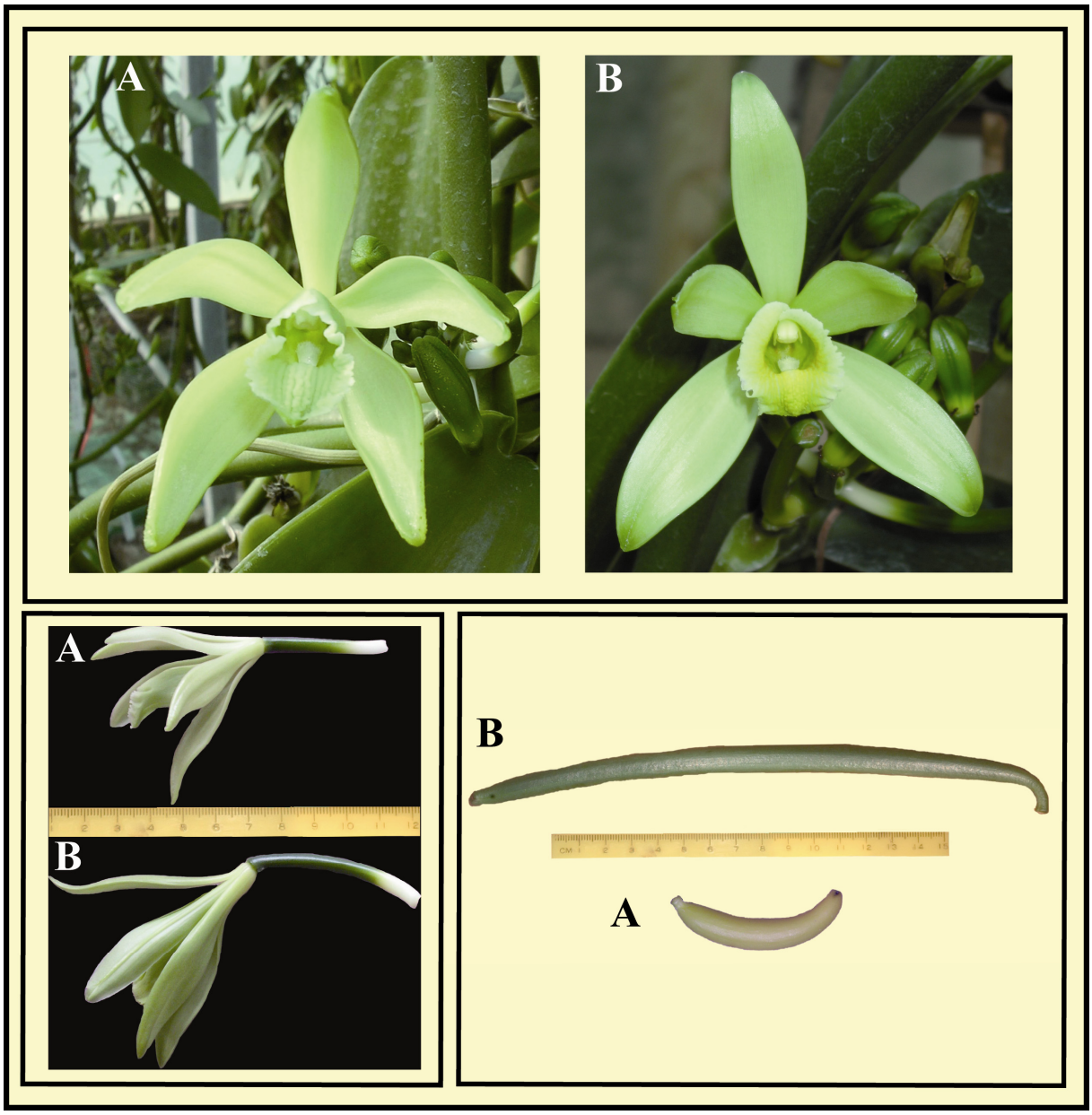


Figure 2.2 : Comparaison des fleurs et des gousses de l'accession SP0068, espèce indéterminée provenant du Costa Rica (A) et de *V. planifolia* (B). Clichés : M. Grisoni.

(submitted-b)), elle est clairement liée à *V. pompona* avec un bootstrap de 98%. Cette accession peut être soit une espèce proche de *V. odorata* et *V. pompona* pas encore identifiée (ou même un hybride), ou un vrai spécimen de *V. odorata* traduisant un important polymorphisme intraspécifique dans cette espèce. Cependant, un seul spécimen identifié de *V. odorata* est à notre disposition et ce résultat doit être considéré avec précaution.

Finalement, le cas de l'accession SP0068 (provenant du Costa Rica) est très intriguant. Ses fleurs ressemblent à celles de *V. planifolia* et de *V. tahitensis,* mais sont plus petites. De plus, elle produit des gousses en forme de petite banane (6-10 cm de long; Figure 2.2). Elle présente quatre allèles au locus microsatellite mVplCIR031 : des allèles espèces-spécifiques asiatiques/africains ainsi que des allèles de *V. bahiana* et *V. pompona* (Tableau 2.1, Figure 2.1). Cette accession est de façon évidente un hybride et pourrait même être tétraploïde. Ainsi, cette accession pourrait représenter un 'pont' entre les espèces de *Vanilla* de l'Afrique-Asie et de l'Amérique. Son origine supposée du Costa Rica doit par ailleurs être vérifiée. Quoiqu'il en soit cette accession représente un cas particulier problématique mais intéressant qui devra être étudié plus avant.

II.4.5. Phylogéographie dans le genre **Vanilla**

Le marqueur mVplCIR031 montre une forte différenciation entre les espèces, en fonction de leur origine géographique. Il permet de séparer d'une part, les accessions américaines avec des allèles plus courts (de 314 à 347 pb) et d'autre part les accessions asiatiques et africaines avec des allèles plus longs (380 à 404 pb).

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer la répartition géographique des espèces du genre *Vanilla* dans le monde. Portères (1954) s'est basé sur des observations de la morphologie florale pour suggérer que le berceau des vanilliers se trouve en Indo-Malaisie. Les espèces auraient migré d'une part vers Madagascar, les Mascareignes et l'Afrique et d'autre part vers l'Asie Orientale et les îles du Pacifique pour finir en Amérique à l'époque du Tertiaire (65.5 – 2.5 MA). D'autres études plus récentes, basées sur des données phylogénétiques,

proposent au contraire une origine américaine pour le genre (Cameron, 1999, 2000). Bien que le genre *Vanilla* soit pantropical, les espèces américaines, africaines et asiatiques sont soeurs, et auraient évolué et migré avant la rupture du Gondwana (160 MA) (Cameron, 2005). Dans notre étude, la nette séparation observée dans les profils microsatellites entre les espèces américaines et afro-asiatiques serait cohérente avec l'hypothèse de Cameron et la spéciation des espèces asiatiques et africaines serait survenue au moment des séparations de l'Inde avec l'Afrique.

Les allèles microsatellites dérivent les uns des autres par insertion ou délétion d'une ou de plusieurs unités de répétition (De Vienne *et al.*, 1998). Cependant, compte tenu de leur mode particulier d'évolution par mutation pas-à-pas, deux allèles de même longueur ne sont pas forcément issus du même ancêtre (identiques par descendance) (De Vienne *et al.*, 1998). Il est intéressant de constater ici que l'évolution du genre *Vanilla* coïncide avec une augmentation du nombre de répétitions au locus mVplCIR031 dans le sens Amérique → Afrique → Asie. Séquencer les différents allèles révélés pourrait permettre de préciser les modes d'évolution de ce locus particulier. Dans tous les cas, il représente d'ores et déjà un marqueur remarquable pour des études génétiques au sein du genre *Vanilla*, du fait de son importante transférabilité, de ses allèles spécifiques des espèces et de ses variations représentatives de la différenciation phylogéographique du genre.

III. Conclusions de l'analyse génétique

Dans ce deuxième chapitre, nous avons élucidé les schémas d'introduction et de diversification des espèces de *Vanilla* cultivées et mis en évidence l'existence d'évènements d'hybridation dans l'évolution du genre *Vanilla*.

V. planifolia a été introduite depuis le Mexique vers l'Océan Indien, les Antilles et le Pacifique. Nous avons montré que ces introductions ont représenté un fort goulot d'étranglement génétique. Il semble y avoir eu un seul génotype introduit pour toutes ces zones (probablement le cultivar 'Mansa' du Mexique). La diversification de *V. planifolia* après son introduction dans l'Océan Indien a entraîné l'apparition de différents phénotypes à La Réunion. De faibles niveaux de diversité génétique ont été révélés, et les variations observées traduisent une accumulation de mutations ponctuelles à travers la reproduction végétative depuis deux siècles. Ces variations génétiques ne présentent cependant pas de corrélation avec les phénotypes. Une exception notable est le phénotype 'Aiguille' qui résulte probablement d'un évènement rare de reproduction sexuée via une autopollinisation.

V. tahitensis présente une base génétique très étroite, et a été confirmée comme étant une espèce génétiquement proche de *V. planifolia*. La diversification de *V. tahitensis* dans les îles du Pacifique est similaire à celle de *V. planifolia* : accumulation de mutations ponctuelles à travers la reproduction végétative et absence de corrélation entre les variations génétiques et les phénotypes.

V. pompona a été introduite depuis l'Amérique vers La Réunion et les îles du Pacifique. De même, nous avons montré l'existence d'un fort goulot d'étranglement génétique dans ces zones. Cependant, les introductions sont différentes à La Réunion et en Polynésie. De plus, les accessions spontanées de *V. pompona* en Amérique tropicale et *V. bahiana* au Brésil présentent de faible (*V. bahiana*) et haut (*V. pompona*) niveaux de diversité génétique, corrélés avec la taille de l'aire naturelle de dispersion de ces espèces et leur reproduction sexuée.

Dans ce chapitre, nous avons confirmé l'existence d'hybrides interspécifiques dans le genre *Vanilla*. Il reste à vérifier l'origine des accessions SP hybrides étudiées auprès de nos partenaires des différents jardins botaniques ayant

fourni ces accessions. Si ces hybrides s'avèrent être effectivement des hybrides naturels, cela permettra de démontrer que des phénomènes d'hybridation interspécifique ont bien contribué à l'évolution du genre *Vanilla*. Il ne semble pas y avoir de barrière majeure aux croisements génétiques entre *V. pompona* et *V. odorata*, *V. pompona* et *V. bahiana*, ainsi qu'entre *V. bahiana* et *V. planifolia*. A l'état naturel, ce type de croisements pourrait se produire. En effet, les aires de répartition citées par Portères (1954) sont chevauchantes pour *V. pompona* et *V. planifolia* du Mexique à la Colombie, et aussi aux Antilles et en Guyanes. Les aires de répartition de *V. odorata* et de *V. pompona* sont chevauchantes en Equateur et en Colombie (Portères, 1954). *V. bahiana* est seulement restreinte au nord-est du Brésil (Pignal, 1994) et pourrait s'être croisée avec des *V. pompona* et/ou *V. planifolia* sub-spontanées dans cette région.

Ce résultat, s'il est confirmé que de tels croisements se sont produits naturellement, est important car il pourrait expliquer les difficultés rencontrées dans la délimitation et l'identification précise des espèces et dans la préparation d'une révision correcte de la taxonomie du genre *Vanilla*.

Finalement, ce chapitre a permis de résoudre avec succès les relations génétiques entre les espèces américaines et a permis de démontrer clairement pour la première fois l'existence d'un fort schéma de différenciation phylogéographique *Nouveau Monde* versus *Ancien Monde* dans le genre *Vanilla*, confirmant les observations morphologiques de Portères (1954) et les suggestions de Soto Arenas (2003) sur la base de marqueurs chloroplastiques (*rbc*L).

Ainsi, suite à l'analyse génétique, il a été possible de préciser l'origine de la variation phénotypique du type 'Aiguille', très probablement issu de reproduction sexuée, par rapport au type 'Classique'. Afin d'élucider les mécanismes à l'origine de l'apparition des types 'Grosse Vanille', 'Stérile', 'Mexique' et 'Variegata', nous allons donc tester les hypothèses de la polyploïdie d'une part et de variations épigénétiques d'autre part dans les chapitres suivants.

Chapitre 3

ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE

VANILLE. ſ. f. Plante qui croît en Amérique. Son fruit que l'on nomme auſſi *Vanille* , eſt fait comme un cornichon long de quatre à cinq pouces , & gros comme le petit doigt. Il contient une multitude de petites ſemences noires. Ce fruit eſt d'une ſaveur aromatique , & d'une odeur très-agréable. Il entre dans la compoſition du chocolat. *La vanille échauffe, fortifie l'eſtomac, & eſt très-propre pour les catharres & les maladies froides. Vn paquet de vanilles. Mettre deux ou trois vanilles dans une livre de chocolat.*

Extrait du DICTIONNAIRE DE L'ACADÉMIE FRANÇOISE. TOME SECOND. 1765. p. 620.

VANILLE, que les Eſpagnols appellent VANILLA ou BANILLA. C'eſt une graine ou ſemence d'une odeur agréable qui avec la gouſſe où elle eſt contenue, eſt le principal ingrédient dont on ſe ſert pour donner du goût & de la force au chocolat.

La gouſſe , où la graine de *vanille* eſt enfermée, eſt longue d'environ un demi-pied , & groſſe comme le petit doigt d'un enfant. La plante qui la produit a des feuilles médiocres qui ſortent des nœuds de ſes tiges. Les tiges ſont foibles , hautes environ de douze ou quinze pieds , enſorte qu'elles ont beſoin d'un appui ; ce qui oblige ceux qui cultivent cette plante de l'appuyer contre quelque mat, ou de la ramer comme on fait en France les pois & les haricots.

Les gouſſes ſont d'abord vertes , elles deviennent enſuite jaunâtres en mûriſſant ; & enfin brunes quand elles ſont mûres. Dans leur parfaite maturité elles ſont remplies d'un ſuc mieleux d'une très-bonne odeur , dans lequel eſt mêlée leur ſemence qui eſt preſque imperceptible : on les cueille quand elles ſont tout-à-fait mûres pour les faire ſécher à l'ombre , & c'eſt ainſi ſechées qu'on les tranſporte en Europe par paquets de cinquante , de cent & de cent cinquante.

Il faut choiſir les gouſſes de *vanille* bien nourries , groſſes , longues , nouvelles, odorantes , peſantes , ſans rides , graſſes , ſouples , & que leur graine ſoit noire & luiſante.

« A l'entrée des cinq groſſes fermes , elle doit , comme omiſe au tarif de 1664, cinq pour cent de la valeur ».

« Elle eſt exempte de droits à la ſortie des cinq groſſes fermes , attendu qu'elle eſt droguerie étrangère ».

« Omiſe au tarif de 1632 , elle doit à la douane de Lyon , cinq pour cent de la valeur , lorſqu'elle vient de l'étranger , & 2 1/3 venant de l'intérieur , & cette valeur a été fixée à 50 liv. par livre peſant ».

« A la douane de Valence elle paye du quinze net, 3 l.11 ſ. » .

« La *vanille* doit en outre un droit additionnel de 3 l. par livre peſant ».

Extrait de l'ENCYCLOPÉDIE MÉTHODIQUE OU PAR ORDRE DE MATIÈRES; PAR UNE SOCIÉTÉ DE GENS DE LETTRES, DE SAVANS ET D'ARTISTES; COMMERCE. TOME TROISIÉME. 1784. pp. 798-799.

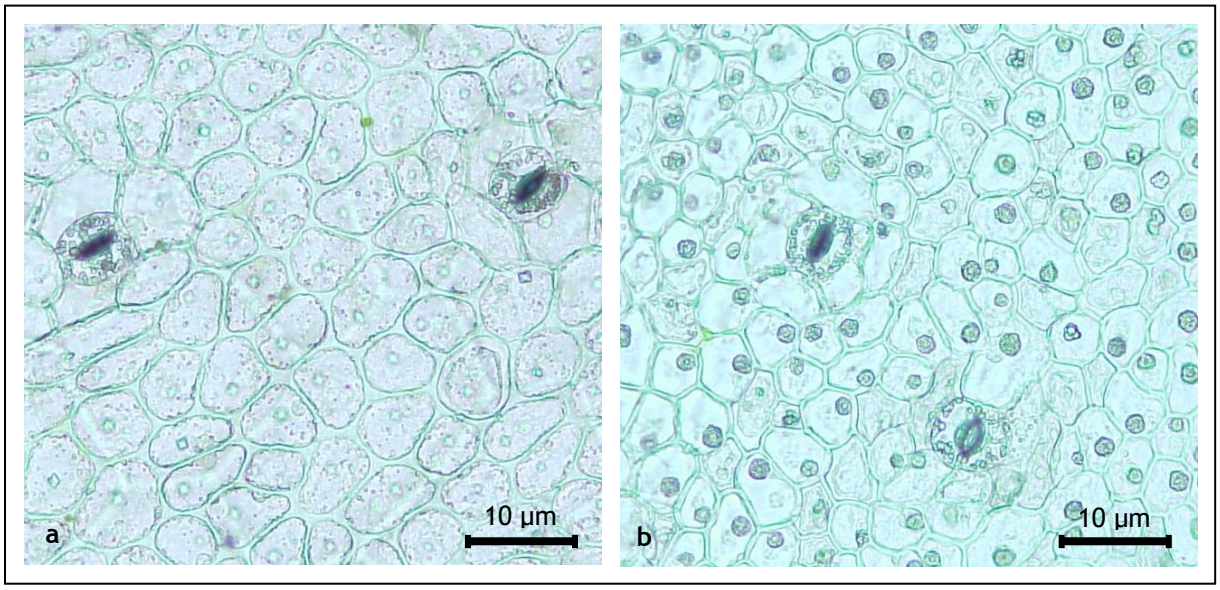


Figure 3.1 : Photographies de stomates et de cellules de l'épiderme inférieur (contenant des cristaux d'oxalate de calcium) des feuilles de (a) *V. planifolia* et (b) *V. pompona*.

CHAPITRE 3 : ANALYSE CYTOGÉNÉTIQUE

I. Préambule

Le troisième chapitre de cette thèse est consacré à l'analyse cytogénétique des vanilliers. Nous avons suggéré dans le chapitre précédent que le phénotype particulier 'Aiguille' rencontré dans une seule plantation réunionnaise avait pour origine l'intervention rare de la reproduction sexuée. Parmi les six phénotypes rencontrés à La Réunion, il reste encore à élucider l'origine des variations phénotypiques par rapport au type 'Classique' observées chez les types 'Mexique', 'Grosse Vanille', 'Stérile' et 'Variegata'.

L'objectif de ce chapitre est de tester l'hypothèse d'une polyploïdie susceptible d'expliquer la variation phénotypique observée au sein des *V. planifolia* dans les zones d'introduction (plus particulièrement de La Réunion) en conditions de reproduction végétative dominante. En effet, Duval *et al*. (2006) ont récemment mis en évidence un phénomène de polyploïdie chez les *V. tahitensis* dans leur zone de culture, la Polynésie française, révélant deux niveaux de ploïdie : diploïde et tétraploïde (type 'Haapape').

De plus, les études cytogénétiques réalisées chez les espèces du genre *Vanilla* sont rares et ne sont pas consacrées à une espèce en particulier. Il nous a semblé pertinent d'élargir ces connaissances sur la cytogénétique au niveau intraspécifique sur l'espèce *V. pompona* qui se caractérise par une large diversité génétique. Enfin une analyse interspécifique a été menée sur d'autres espèces du genre *Vanilla* afin d'estimer l'ampleur des phénomènes de polyploïdie dans l'évolution du genre.

Différentes analyses cytogénétiques ont été effectuées : l'évaluation de la quantité d'ADN nucléaire par cytométrie en flux et par microdensitométrie, des comptages chromosomiques sur racines (Annexe 5) et pollen ainsi que des mesures de longueur de stomates (Figure 3.1).

Le premier article de ce chapitre (soumis) se concentre sur l'espèce *V. planifolia*. Cet article révèle l'existence de phénomènes récents d'autopolyploïdisation à La Réunion, et permet d'expliquer les particularités des types 'Grosse Vanille' et 'Stérile' par la tétraploïdie et la triploïdie, respectivement.

Le deuxième article de ce chapitre (en préparation) se concentre plus particulièrement sur l'espèce *V. pompona*, qui présente des caractéristiques morphologiques similaires au phénotype 'Grosse Vanille' de *V. planifolia*. Cet article permet de mettre en évidence que *V. pompona* pourrait être un polyploïde ancien, probablement tétraploïde, ayant évolué par des fusions chromosomiques et par des contractions génomiques.

L'analyse cytogénétique a été élargie à d'autres espèces du genre *Vanilla* et les résultats obtenus en cytométrie en flux et par comptages chromosomiques sont exposés en troisième partie de ce chapitre.

Enfin, en quatrième partie de ce chapitre sont présentés des résultats complémentaires, préliminaires, sur la recherche du nombre chromosomique de base chez *V. planifolia* (types 'Classique' et 'Stérile'), *V. pompona*, *V. bahiana* et *V. tahitensis* par comptage des chromosomes sur pollen ainsi que la confirmation des causes de l'autostérilité d'un phénotype 'Stérile' de *V. planifolia*.

Article N°4 :

Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae)

Séverine BORY [1,4] - Olivier CATRICE [2] - Spencer BROWN [2] - Ilia J. LEITCH [3] - Rodolphe GIGANT [4] - Frédéric CHIROLEU [1] - Michel GRISONI [1] - Marie-France DUVAL [5] - Pascale BESSE [4]

[1] CIRAD, UMR PVBMT Cirad - Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

[2] Groupe "Dynamique de la compartimentation cellulaire", Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR 2355, bât 23/24, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[3] Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3DS, UK

[4] Université de La Réunion, UMR PVBMT Cirad - Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis messag cedex 9, La Réunion, France

[5] CIRAD, UPR Multiplication Végétative, Boulevard de la Lironde, TA A-75/02, 34398 Montpellier cedex 5, France

Soumis à :

Annals of Botany, MS # 07846

Mots clés : aneuploïdie, nombre chromosomique, quantité d'ADN, cytométrie en flux, densitométrie de Feulgen, taille du génome, polyploïdie, stomates, *Vanilla planifolia*

Résumé

Les accessions de *Vanilla planifolia* cultivées à l'île de La Réunion présentent des variations phénotypiques importantes qui ne peuvent pas être expliquées par des variations génétiques. Cette étude a été réalisée pour vérifier si la polyploïdie pouvait être responsable des variations phénotypiques intraspécifiques observées. La quantité d'ADN nucléaire de cinquante accessions de *V. planifolia* a été recherchée par cytométrie en flux et confirmée par microdensitométrie de Feulgen

pour trois accessions. Afin de vérifier les niveaux de ploïdie détectés par cytométrie en flux, des comptages chromosomiques ont été réalisés à partir des racines aériennes de six accessions. Des longueurs de stomates ont été mesurées pour douze accessions afin de mettre en évidence le possible impact de la polyploïdie sur la morphologie. *V. planifolia* présente une forte aneuploïdie somatique dans les cellules de racines, ainsi qu'une endoréplication révélée par la cytométrie en flux. Les valeurs 2C de cinquante accessions se répartissent en trois groupes distincts avec en moyenne 5.03 pg pour la plupart des accessions, 7.67 pg pour les phénotypes 'Stérile' et 10.00 pg pour les phénotypes 'Grosse Vanille'. Les nombres chromosomiques varient de 16 à 54 chromosomes par cellule. Les longueurs de stomates montrent une variation significative de 37.75 µm à 48.25 µm. Etant donné que les valeurs 2C, les nombres chromosomiques moyens et les longueurs de stomates sont corrélés positivement, et que les accessions étudiées n'ont pas pu être différenciées par des marqueurs moléculaires, ces résultats supportent la présence de récents types autotriploïdes et autotétraploïdes à l'île de La Réunion. Cet article est la première étude mettant en évidence une autopolyploïdie récente chez *V. planifolia* qui pourrait avoir contribué aux variations phénotypiques observées chez cette espèce. Les longueurs de stomates sont des bons indicateurs de ses niveaux de ploïdie.

A4.1. Abstract

Background and aims

Vanilla planifolia accessions cultivated in Reunion Island display important phenotypic variations that can not be explained by genetic variations. This study was performed to verify if polyploidy could be responsible for some of the intraspecific phenotypic variations observed.

Methods

The nuclear DNA content of fifty accessions of *V. planifolia* was assessed by flow cytometry and confirmed by Feulgen microdensitometry for three accessions. To verify the ploidy levels detected with flow cytometry, chromosome counts were made from aerial root tips for six accessions. Stomatal lengths were also measured from twelve accessions to assess the possible impact of polyploidy on morphology.

Key results

V. planifolia exhibited a strong somatic aneuploidy in root cells, as well as endoreduplication as revealed by flow cytometry. The 2C-values of the fifty accessions segregated into three distinct groups averaging 5.03 pg (for most accessions), 7.67 pg (for the 'Stérile' phenotypes) and 10.00 pg (for the 'Grosse Vanille' phenotypes). Chromosome numbers varied from 16 to 54 chromosomes per cell. The stomatal length showed a significant variation from 37.75 µm to 48.25 µm. Given that 2C-values, mean chromosome numbers and stomatal length were positively correlated, and that the surveyed accessions could not be previously differentiated using molecular markers, these results support the occurrence of recent autotriploid and autotetraploid types in Reunion Island.

Conclusions

This is the first report showing evidence of a recent autopolyploidy in *V. planifolia* that may have contributed to the phenotypic variation observed in this species. Stomatal length was shown to be a good indicator of ploidy level in this species.

A4.2. Introduction

Vanilla planifolia G. Jackson, syn. *V. fragrans* (Salisb.) Ames (Orchidaceae) probably originated from South-Eastern Mexico (Soto Arenas, 1999a) although it is now cultivated worldwide in the tropics. Cuttings of *V. planifolia* were introduced to Reunion Island, about 200 years ago. Of the five primary successive vanilla introductions cited in the literature (Bory *et al.*, 2007), it is generally admitted that only one (by Marchant in 1822) was successful. In Reunion Island, natural pollinators are missing and vanilla is reproduced vegetatively. Nevertheless, phenotypic variations in leaf color, shape and thickness, pod shape, stem thickness and fertility are observed among the accessions in Reunion Island (Bory *et al.*, 2007). We recently demonstrated that accessions in Reunion Island originated from a limited number of introductions (probably of a single clonal origin from Mexico) and that *V. planifolia* has subsequently evolved through the accumulation of somatic point mutations in the course of vegetative propagation, that could not be correlated to phenotypes. The only notable exception was the rare 'Aiguille' type which was shown to result from sexual reproduction (Bory *et al.*, submitted-b). Given that different ploidy levels (diploid and tetraploid) were detected in *V. tahitensis*, another cultivated *Vanilla* species (Duval *et al.*, 2006), we suggested that polyploidy could be a possible explanation for some of the phenotypic variation observed in *V. planifolia* (Duval *et al.*, 2006; Bory *et al.*, 2007). Indeed, hybridization and polyploidy are known to be important processes which can lead to plant diversification and speciation (Stebbins, 1950; Grant, 1981) and are considered as having major ecological consequences (Lewis, 1980). Polyploidy is a rapid and dramatic mechanism that can double the whole genome and hence genome size in a single generation, and all flowering plants are considered to be either current polyploids or to have experienced a polyploidization event in their evolutionary history (Wendel, 2000). Genome size has previously been reported for *V. planifolia* but incongruent results were obtained with reported 2C-values around 6 pg by cytophotometry (Kausch et Horner, 1984) and 15 pg by flow cytometry (Arumuganathan et Earle, 1991b; Jones *et al.*, 1998; Zonneveld *et al.*, 2005). Chromosome numbers have also been counted and the majority of the references

TABLE 1: Code, place of origin of *V. planifolia* and results of flow cytometry.

Code [1]	Place of origin	Mean 2C pg (± s.d.)	N [2]	Group	Code [1]	Place of origin	Mean 2C pg (± s.d.)	N [2]	Group
PLm0001	Reunion Island	4.96 (± 0.02)	2	A	**PLm0627**	Reunion Island	5.03	1	A
PLm0002	Reunion Island	4.94 (± 0.22)	3	A	**PLa0628**	Reunion Island	4.97 (± 0.18)	4	A
PL0004	Costa Rica	4.66	1	A	**PLa0629**	Reunion Island	4.82	1	A
PL0006	Central America	5.15	1	A	**PLc0631**	Reunion Island	5.21 (± 0.16)	4	A
PL0008	Guatemala	4.79	1	A	**PLm0632**	Reunion Island	5.18 (± 0.17)	3	A
PL0009	Central America	4.84	1	A	**PLc0638**	Reunion Island	5.14 (± 0.13)	5	A
PL0010	Costa Rica	5.02 (± 0.24)	4	A	**PLc0642**	Reunion Island	5.01 (± 0.09)	3	A
PL0012	Central America	4.71	1	A	**PLc0647**	Reunion Island	5.16 (± 0.07)	2	A
PL0014	Unknown	5.09 (± 0.16)	3	A	**PL0648**	Reunion Island	5.11 (± 0.02)	2	A
PL0016	Samoa	5.01 (± 0.22)	6	A	**PLm0649**	Reunion Island	4.94 (± 0.16)	3	A
PL0023	Reunion Island	4.70	1	A	**PLc0650**	Reunion Island	5.23 (± 0.18)	3	A
PL0037	Madagascar	5.27 (± 0.18)	3	A	**PLc0651**	Reunion Island	4.98 (± 0.07)	2	A
PL0038	Madagascar	5.12 (± 0.21)	3	A	**PLc0656**	Reunion Island	5.16 (± 0.02)	2	A
PL0050	Guadeloupe	5.18 (± 0.04)	3	A	**PLc0660**	Reunion Island	5.08 (± 0.01)	2	A
PL0051	Guadeloupe	5.21 (± 0.08)	2	A	**PL0673**	Samoa	5.22 (± 0.07)	2	A
PLv0057	France	5.00 (± 0.13)	2	A	**PL0701**	United Kingdom	5.07 (± 0.08)	2	A
PL0090	Seychelles	5.11 (± 0.18)	3	A	**PL0713**	Reunion Island	4.97 (± 0.19)	2	A
PL0111	France	5.30 (± 0.22)	3	A	**PL0800**	Vanuatu	5.07 (± 0.03)	2	A
PL0132	Madagascar	5.16 (± 0.20)	3	A	**PLst0645**	Reunion Island	7.78 (± 0.16)	3	B
PL0134	Madagascar	5.07 (± 0.19)	5	A	**PLst0630**	Reunion Island	7.57 (± 0.23)	5	B
PL0136	Madagascar	4.98 (± 0.13)	4	A	**PLgv0641**	Reunion Island	9.92 (± 0.40)	3	C
PL0148	Reunion Island	4.83 (± 0.07)	3	A	**PLgv0643**	Reunion Island	9.88 (± 0.14)	4	C
PLv0149	France	5.11 (± 0.24)	4	A	**PLgv0644**	Reunion Island	10.15 (± 0.40)	3	C
PL0150	French Polynesia	4.86	1	A	**PLgv0646**	Reunion Island	10.38 (± 0.14)	3	C
PL0624	Reunion Island	4.83	1	A	**PLgv0802**	Reunion Island	9.65 (± 0.17)	2	C

[1]Accessions with a lower case have a determined morphotype, a: 'Aiguille', c: 'Classique', gv: 'Grosse Vanille', m: 'Mexique', st: 'Stérile', v: 'Variegata'. The number corresponds to the accession number in the CIRAD collection.

[2]N: number of repeats (or analyzed leaves) with flow cytometry.

indicate 2n = 32 for *V. planifolia* (Hoffmann, 1929, 1930; Heim, 1954; Chardard, 1963; Martin, 1963). However, some authors have reported intra-individual variations in chromosome numbers (Hurel-Py, 1938; Nair et Ravindran, 1994).

The aim of this study was to analyze nuclear 2C-values and chromosome numbers in geographical diverse accessions of *V. planifolia*. Given that variations in genome size and chromosome number were revealed at the intraspecific level we also examined relationships between 2C DNA content, chromosome numbers in relation to ploidy level and phenotypic variations (particularly stomatal length) in this species. This paper presents the first broad cytogenetic study on the species *V. planifolia*.

A4.3. Materials and methods

A4.3.1. Plant material

The 50 accessions of *V. planifolia* studied comprise the six phenotypes identified in vanilla plantations in Reunion Island (Bory *et al.*, 2007) as well as samples from other geographical origins (Table 1). Samples were collected from vines maintained in the collection of vanilla genetic resources of CIRAD in Reunion Island (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) (Grisoni *et al.*, 2007). This collection contains accessions which have been obtained from exchanges with botanical gardens, private collections, or collected during field surveys. Entire leaves were collected for flow cytometry analyses and stomatal length measurements and aerial root tips were harvested for microdensitometry analysis and chromosome counts. Full details of each accession (e.g. place of origins, phenotypes and types of analyses) are presented in Tables 1 and 2.

A4.3.2. Determination of DNA content by flow cytometry

In order to extract nuclei from the 50 *V. planifolia* samples, 100 mm^2 leaf pieces were co-chopped with wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring nuclei (2C = 30.9 pg; 43.7% GC) which was used as the internal calibration standard (Marie

TABLE 2: Results from the Feulgen microdensitometry, chromosome counts and stomatal length.

	Flow cytometry	Feulgen microdensitometry		Chromosome counts		Stomatal length	
Code [1]	**Group**	**Mean 2C pg (± s.d.)**	**Number of cells**	**Mean number (± s.d.)** [2]	**Number of cells**	**Mean length (± s.d.)** [3]	**Number of stomata**
PLc0651	A	5.05 (± 0.50)	90				
PLm0001	A	4.54 (± 0.24)	90				
PLc0642	A			22.11 (± 4.52) [a]	35	37.65 (± 2.16) [a]	30
PLc0660	A					38.00 (± 1.79) [a]	30
PL0010	A					37.75 (± 1.78) [a]	30
PLa0628	A			23.69 (± 3.87) [a]	72	38.42 (± 2.02) [ab]	30
PL0148	A					39.75 (± 2.40) [bc]	30
PL0038	A					41.25 (± 2.15) [c]	30
PLst0645	B			26.57 (± 5.22) [b]	81	43.08 (± 2.52) [d]	30
PLst0630	B			28.41 (± 4.77) [bc]	59	43.67 (± 2.60) [d]	30
PLgv0644	C			30.23 (± 4.02) [cd]	35	47.33 (± 3.07) [e]	30
PLgv0641	C			33.67 (± 5.83) [d]	42	47.58 (± 2.82) [e]	30
PLgv0643	C	9.98 (± 0.61)	90			48.17 (± 3.41) [e]	30
PLgv0646	C					48.25 (± 2.64) [e]	30

[1] For accession codes see Table 1.

[2] Mean values with different letters are significantly different according to Wilcoxon rank sum test at level 0.05.

[3] Mean values with different letters are significantly different according to Student *t*-test at level 0.05.

et Brown, 1993). The optimal nuclear isolation buffer was composed of tissue culture salts, 600 mM sorbitol, 1% (w/v) Triton X-100 and fresh 10 mM sodium metabisulfite. Fifty micrograms each of RNase and DNA-binding fluorochrome propidium iodide (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) were added immediately after the isolation of nuclei. After incubation for 10 min, flow cytometric analysis was performed on an EPICS ELITE ESP flow cytometer (Beckman-Coulter, Fullerton, California, USA) fitted with an Argon laser 488 nm. Propidium iodide fluorescence associated with the nuclei was taken at 600-630 nm. For most accessions, at least two replicates were analyzed to obtain a mean DNA content. Histograms of fluorescence intensities were based on at least 5000 nuclei per sample. Total 2C DNA content of the analyzed accession ($2C_{Vanilla}$) was calculated using the linear relationship between the fluorescence signals from the first population of isolated nuclei of *Vanilla* ($I_{Vanilla}$) and the internal standard (I_{Wheat} and $2C_{Wheat}$) according to the following equation: $2C_{Vanilla} = I_{Vanilla} / I_{Wheat} \times 2C_{Wheat}$. Given the peculiar endoreplication present in *V. planifolia*, it was essential to distinguish the low frequency 2C population from the dominant endoreplicated nuclei which most laboratories appear to mistake for the ground state 2C nuclei.

A4.3.3. Determination of DNA content by Feulgen microdensitometry

Aerial root tips from three *V. planifolia* accessions were collected and fixed in freshly prepared 3:1 (v/v) absolute ethanol/glacial acetic acid for a minimum of 24 h at 4°C. After rinsing with distilled water for 5 min, a cold hydrolysis step was performed in 5N HCl in a waterbath at 20°C for 1 h. After rinsing three times in distilled water for 3 min, root tips were stained in pararosaniline solution for 1.5 h at ambient temperature in the dark, rinsed thoroughly in SO_2 water three times for 10 min, transferred to distilled water and stored in the dark overnight at 4°C. Finally, the roots were squashed in 45% acetic acid. Three readings each of ten cells at prophase (4C) on each of three slides were made using a Vickers M85a scanning microdensitometer (Vickers Ltd, York, UK). Total 2C DNA content of the analyzed accession was calculated from the 4C-value ($4C_{Vanilla}$) which was determined using the linear relationship between the absorbance signals from stained nuclei of *Vanilla* ($A_{Vanilla}$) and the calibration standard *Pisum sativum* L. cv.

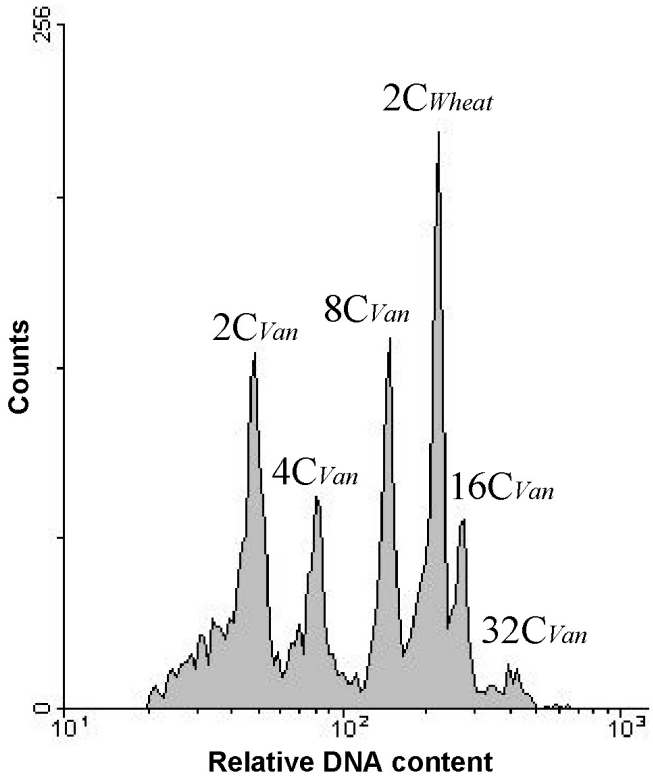


FIG. 1: Histogram from flow cytometry showing endoreplication for *V. planifolia* PLm0001, and the internal standard wheat. The abscissa is a log scale of relative intensity in propidium iodide stained nuclei.

Minerva Maple (4C = 19.46 pg; (Bennett et Smith, 1991)) (A_{Pisum} and $4C_{Pisum}$) according to the following equation: $4C_{Vanilla} = A_{Vanilla} / A_{Pisum} x\ 4C_{Pisum}$.

A4.3.4. Determination of chromosome number

Chromosome counts from aerial root tips were made for six *V. planifolia* accessions using the protocol of Arends and Van Der Laan (1986) with slight modifications. Actively growing aerial root tips were collected, longitudinally cut and washed with distilled water. Root tips were pretreated with 0.002 M 8-hydroxyquinoline (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) for 3 h at ambient temperature (20-25°C) in the dark then fixed in freshly prepared 3:1 (v/v) absolute ethanol/glacial acetic acid overnight at ambient temperature. Root tips were then hydrolyzed in 1N HCl in an oven at 65°C for 5 min and stained in 2% aceto-orceine for a minimum of 2 h at ambient temperature. Root tips were squashed on two permanent slides with a needle in very small pieces in Kaiser gelatine-glycerol (Merck, Whitehouse station, New Jersey, USA). Slides were left in an oven at 37°C for a minimum of 48h. Cytological observations were made with a microscope Leitz DM RBE (Leica, Wetzlar, Germany). Cells of aerial root tips were counted at the metaphase stage, when possible, or prometaphase stage, both characterized by well differentiated and condensed chromosomes without chromocentres. Cells were entire, without nucleolus.

A4.3.5. Measurement of stomatal length

Stomatal lengths were measured for 12 *V. planifolia* accessions using three mature leaves per plant. One cm^2 of epidermis of the lower leaf surface was removed and placed on a slide. Stomatal size was determined by measuring the guard cell length. A random sample of ten stomata was measured for each leaf on a Leitz DM RBE microscope.

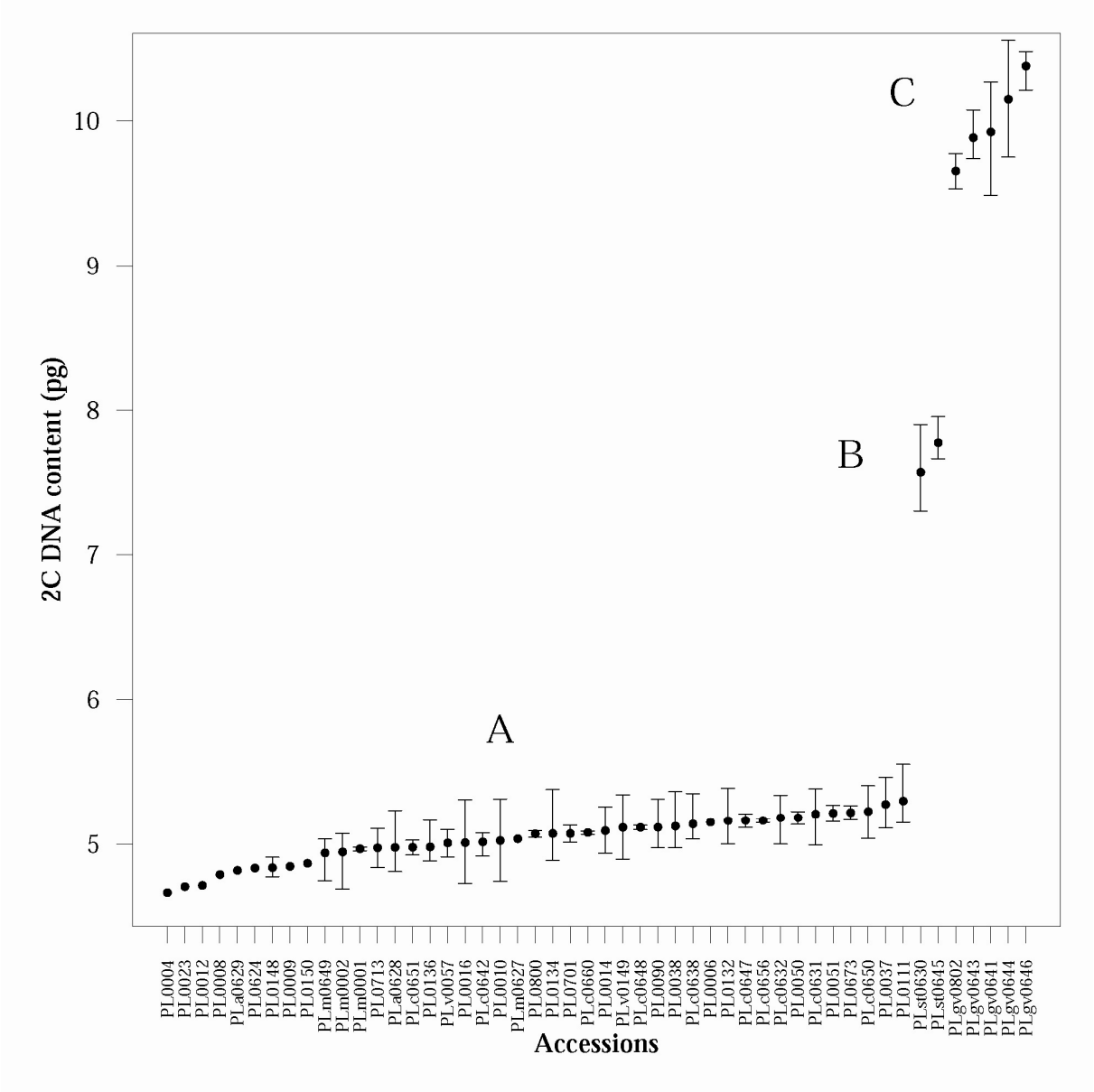


FIG. 2: Graph showing the 2C DNA contents for 50 *V. planifolia* accessions, estimated by flow cytometry. Points represent means and whiskers represent the data range.

A4.3.6. Data analysis

Data were analyzed using R software for windows (version 2.5.1; (R Development Core Team, 2006), Vienna, Austria). Effect of origin was tested for chromosome counts by a pairwise comparison Wilcoxon rank sum test at level 0.05 with the p-value adjustment method of Benjamini & Yekutieli (2001). Effect of origin was tested by ANOVA at level 0.05 for stomatal length. The response variable was transformed using the Box-Cox method (Box et Cox, 1964) to verify homoscedasticity. Random effect of factor "Leaf" was tested with a Fisher test at level 0.05. A pairwise mean comparison Student's *t*-test at level 0.05 was used to compare means with the p-value adjustment method of Benjamini & Yekutieli. The relationships between chromosome counts and 2C-values, between chromosome counts and stomatal length, and between 2C-values and stomatal length, were estimated by linear regression according to Chambers (1992).

A4.4. Results

A4.4.1. Flow cytometry

Holoploid genome sizes i.e. nuclear 2C-value (as defined by (Greilhuber *et al.*, 2005)) were obtained for 50 accessions of *V. planifolia*, with two to six repeats for the majority of the accessions (no repeat for ten accessions) (Table 1). Fluorescence histograms revealed endoreplication resulting in five peaks that corresponded to 2C, 4C, 8C, 16C and 32C nuclei (Fig. 1). The marginal replication ratio, which is the ratio between each peak position, was irregular with 1.4, 1.6, 1.7 and 1.8 (instead of 2) within each histogram but constant between all accessions despite protocol changes (data not shown). This developmentally-regulated "progressively partial endoreplication" unique to orchids will be described elsewhere: the importance here was not to overlook the true 2C nuclear population which may be only at trace levels, constituting ~5% of isolated nuclei.

Three groups of 2C-values were clearly delimited (Fig. 2). Group A, comprising 43 accessions, had 2C-values ranging from 4.66 to 5.30 pg with a mean of 5.03 pg (± 0.16). This group comprised the majority of the *V. planifolia*

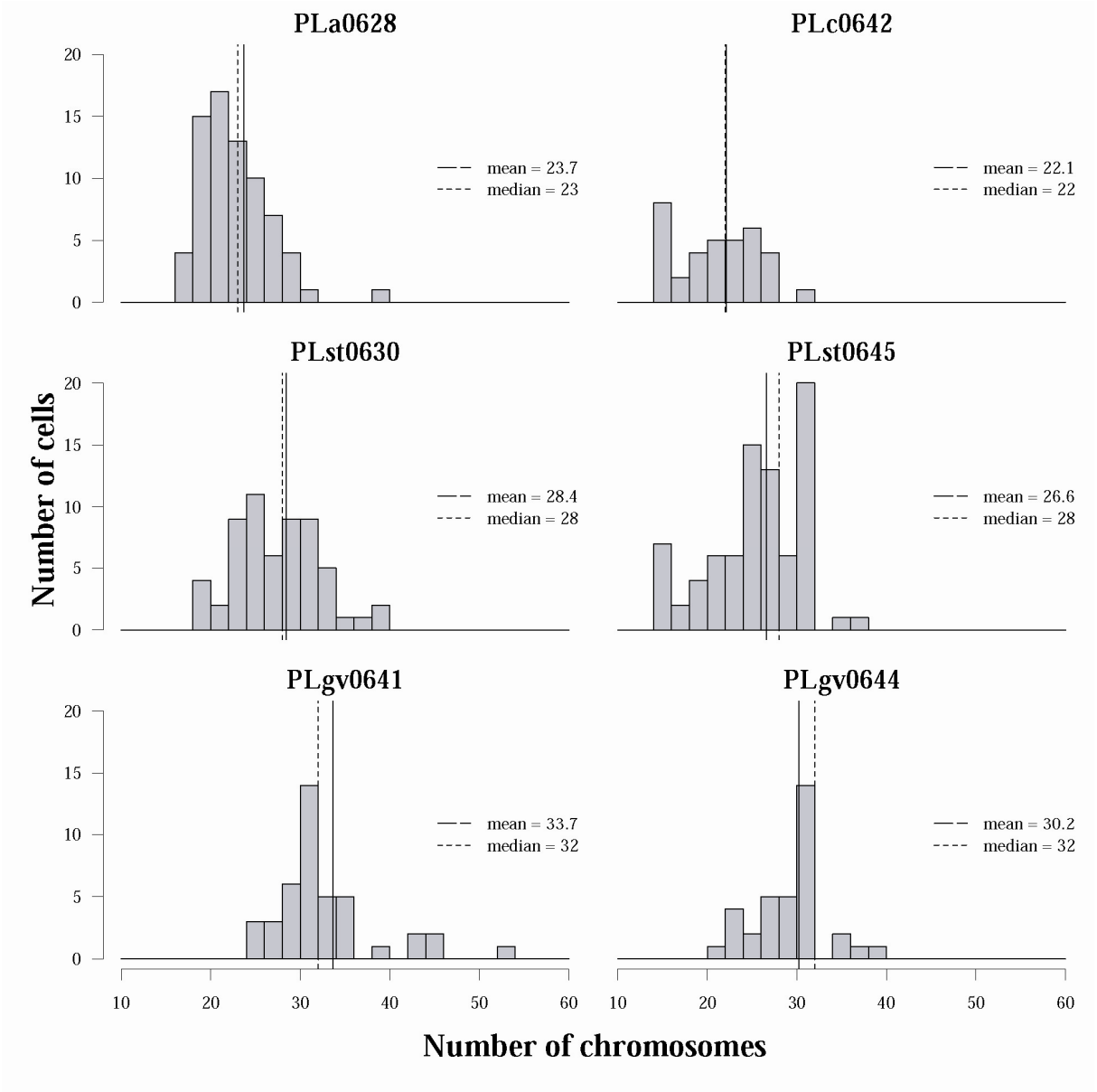


FIG. 3: Graphs showing the range and frequency of chromosomes numbers obtained for six *V. planifolia* accessions. The accessions PLa0628 and PLc0642 belong to group A from flow cytometry, PLst0630 and PLst0645 belong to group B and PLgv0641 and PLgv0644 belong to group C. Mean chromosome number is represented by a solid line and median by a dotted line.

accessions from Reunion Island and from other geographical origins (Table 1). The two Reunion Island accessions of the 'Stérile' type constituted group B, with 2C-values ranging from 7.57 to 7.78 pg with a mean of 7.67 pg (± 0.14). Group C had 2C-values ranging from 9.65 to 10.38 pg with a mean of 10.00 pg (± 0.28). It contained the five accessions from Reunion Island with the phenotype 'Grosse Vanille'. The coefficients of variation within groups did not exceed 5%.

A4.4.2. Feulgen microdensitometry

Feulgen microdensitometry was used to estimate holoploid genome size in three accessions of *V. planifolia* using *Pisum sativum* as the calibration standard. Accession PLm0001 had a 2C-value of 4.54 pg (± 0.24), PLc0651 a 2C-value of 5.05 pg (± 0.50) and PLgv0643 a 2C-value of 9.98 pg (± 0.61). These results were consistent with those obtained with flow cytometry (Tables 1 and 2).

A4.4.3. Determination of chromosome number

Six accessions, two for each 2C DNA content group, were counted (Fig. 3). There was a large intra-individual and intraspecific variation in the chromosome numbers (from 16 to 54 chromosomes per cell) (Table 2, Fig. 3). Accessions PLa0628 and PLc0642, belonging to group A (mean 2C-value = 5.03 pg), displayed mean chromosome numbers of 23.69 (± 3.87) and 22.11 (± 4.52) respectively. Accessions PLst0630 and PLst0645, belonging to group B (mean 2C-value = 7.67 pg), showed mean chromosome numbers of 28.41 (± 4.77) and 26.57 (± 5.22) respectively. Finally, accessions PLgv0641 and PLgv0644, belonging to group C (mean 2C-value = 10.00 pg), exhibited mean chromosome numbers of 33.67 (± 5.83) and 30.23 (± 4.02) respectively. Pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test showed that accessions of group A (PLa0628 and PLc0642) had significantly lower chromosome numbers than accessions of groups B and C (Table 2). Two accessions of group C were just significantly different (P = 0.027), and only PLgv0641 was shown to be significantly different from group B.

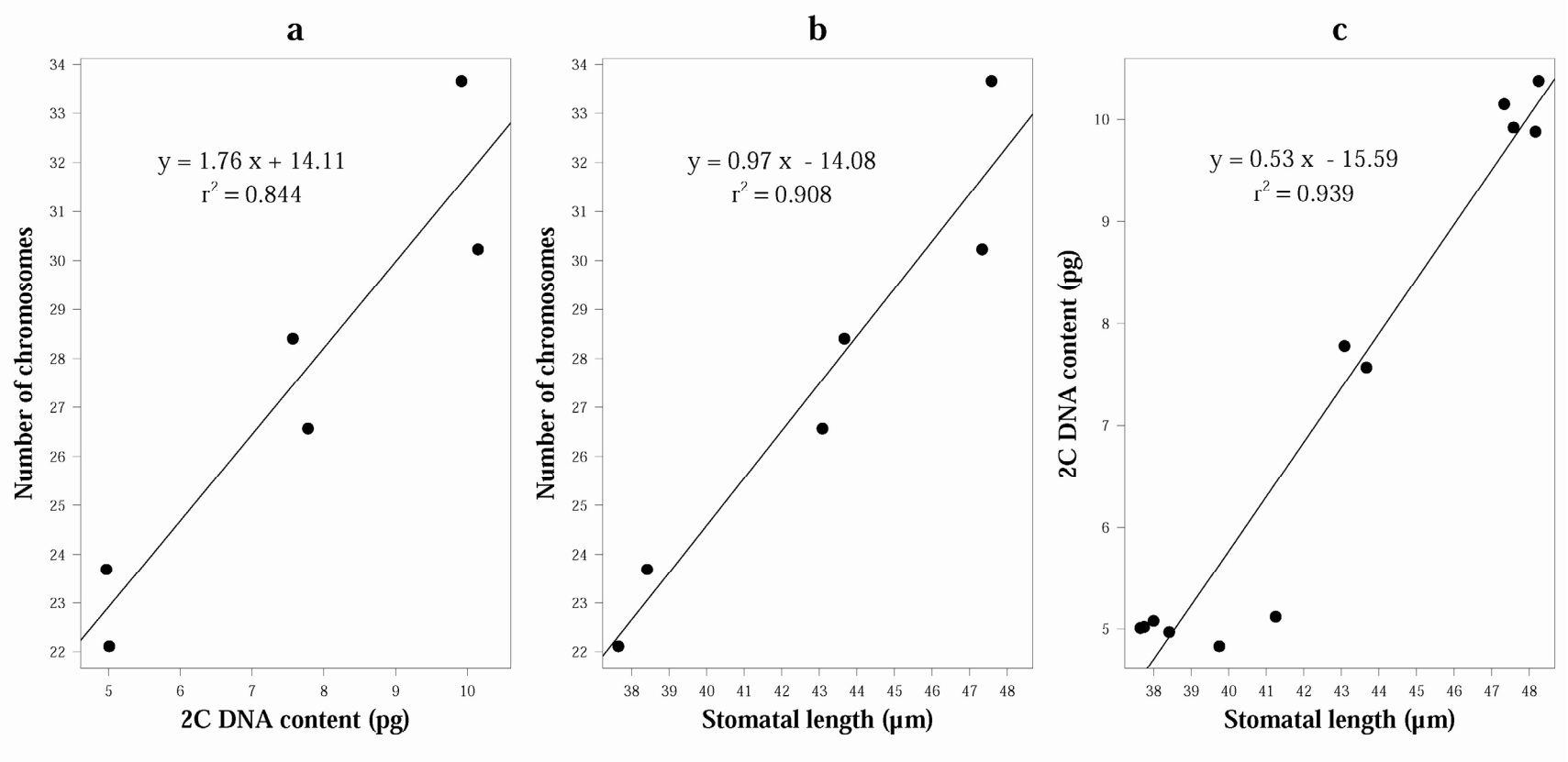


FIG. 4: Linear correlation between three variables: a) Relationship between chromosome number and 2C DNA content for six *V. planifolia* accessions, each accession being represented by mean chromosome number and 2C DNA content (pg); b) Relationship between chromosome number and stomatal length for six *V. planifolia* accessions, each accession being represented by mean chromosome number and mean stomatal length (µm); c) Relationship between 2C DNA content and stomatal length for 12 *V. planifolia* accessions. On each graph are noted the estimated equation of the linear regression and the value of the determination coefficient r^2.

A4.4.4. Measure of stomatal length

The mean length of stomata in 12 *V. planifolia* accessions ranged from 37.65 µm to 48.25 µm (Table 2). Due to heteroscedasticity of ANOVA residuals observed with Bartlett test (P = 0.006), stomatal lengths were transformed by the Box-Cox method. Random effect of the factor "Leaf" was not significant (P = 0.131). Then one-way ANOVA showed a strong significant effect for the "Accession" factor (P < 0.001). Three groups of stomatal lengths were distinguished with pairwise mean comparison Student's *t*-test at level 0.05 (Table 2): (i) a heterogeneous group comprising six accessions from group A (PLc0642, PL0010, PLc0660, PLa0628, PL0148, PL0038) with short stomatal lengths (between 37 and 41.5 µm); (ii) a group comprising the two 'Stérile' accessions from group B (PLst0645, PLst0630) with intermediate lengths (between 43 and 44 µm) and (iii) a group comprising the four 'Grosse Vanille' accessions from group C (PLgv0644, PLgv0641, PLgv0643, PLgv0646) with the longest stomatal lengths recorded (greater than 47 µm).

A4.4.5. Relationship between DNA content, chromosome number and stomatal length

The regression coefficients between each pair of analyzed variables were estimated (Fig. 4). Strong positive linear correlation was found between chromosome number, 2C DNA content and stomatal length with slopes significantly different from zero (P = 0.006, 0.02 and $1.29E^{-7}$, respectively). Coefficient of determination was strong when stomatal length explained chromosome counts (r^2 = 0.908) and 2C DNA content (r^2 = 0.939). It was less important when 2C DNA content explained chromosome counts (r^2 = 0.844).

A4.5. Discussion

A4.5.1. **V. planifolia** *2C DNA content*

A mean 2C-value of 5.03 pg, was found in the majority of sampled *V. planifolia.* The DNA 2C-values found in this study are close to those reported by

Kausch and Horner (1984) giving a 2C-value of 6.3 pg using cytophotometry for all diploid cortical parenchyma cells of *V. planifolia*. These authors took 2C = 2.62 pg for chicken, whereas the more common value is 2.33 pg (Galbraith *et al.*, 1983), in which case estimates are even closer.

However, these values contradict other studies using flow cytometry: Arumuganathan and Earle (1991b) indicated a 2C-value of 15.9 pg for *V. planifolia* and Zonneveld *et al*. (2005) reported 15.5 pg. The isolation and identification of 2C nuclei is primordial (Price et Johnston, 1996): the 2C peak can be masked in a background noise of cell debris (fragmented nuclei, cytoplasmic clusters) if the proportion of 2C nuclei is low (Brown *et al.*, 2007) because of endoreplication. In this case, the second peak (4C) or higher endoreplicated nuclei are mistakenly taken as the 2C peak leading to a gross error in the estimation of nuclear DNA content. This might be the case for the cited flow cytometry reports.

Price and Johnston (1996) listed three possible sources of error in DNA content determinations: errors associated with choice of the calibration standard, as also pointed out by Bennett and Leitch (2005) and Catrice *et al.* (2006) and non-specific staining, further explored by different authors (Noirot *et al.*, 2000; Noirot *et al.*, 2003a; Loureiro *et al.*, 2006). The choice of standard is a critical consideration. For the current work we used *Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring with a 2C-value of 30.9 pg and a GC content of 43.7% (close to *V. planifolia* (40%, (Brown *et al.*, 2007)). The 2C peaks of *Triticum* did not overlap the 2C vanilla peak but necessitated a strong interpolation. Zonneveld *et al*. (2005) used *Agave americana* (2C = 15.9 pg) as standard and found a 2C-value of 15.5 pg for *V. planifolia*. The 2C peaks for *Vanilla* and *Agave* must have overlapped so it is unclear how the DNA content of *V. planifolia* was determined. Our data agree with genome size estimates for vanilla made using different standards (*Petunia hybrida* (Hort.) PxPc6, 2C = 2.85 pg, *Lycopersicon esculentum* Mill, cv. Roma, 2C = 1.99 pg) (Brown *et al.*, 2007). Moreover the two extreme values determined with flow cytometry were confirmed with Feulgen microdensitometry. Taken together these observations add further support to reliability of our estimate and indicate that the recognized 2C-value for diploid *V. planifolia* should be rectified to 5 pg.

A4.5.2. Endoreplication

The monosomatic cycle is seen in cytometry as two distinct peaks of different fluorescence intensities: the 2C peak (corresponding to G_0+G_1 phase of the cell cycle) and, at twice the intensity, the 4C peak (G_2+M phase of the cell cycle). Sometimes, multiple peaks corresponding to higher levels of ploidy can also be seen in various tissues of plant species such as *Brassica* (Kudo et Kimura, 2001), *Arabidopsis* (Melaragno *et al.*, 1993), and orchids (Lim et Loh, 2003; Yang et Loh, 2004). This was the case in *V. planifolia*. Our results also confirmed those of a recent study (Brown *et al.*, 2007) that revealed a progressively partial endoreplication in *V. planifolia*, with a marginal replication ratio of 1.4, 1.6, 1.7 and 1.8 instead of 2. Nothing is known concerning the mechanisms in play, whether they result from partial replication of the DNA or excision of DNA following whole genome replication, but they occur in many orchids (Brown *et al.*, 2007).

A4.5.3. Somatic aneuploidy

Chromosome counts on aerial root tips revealed important intra-individual variations (Fig. 3) indicating a high frequency of aneuploidy in the somatic cells studied. Therefore reports indicating a unique value 2n = 32 chromosomes for *V. planifolia* are questioned (Hoffmann, 1929, 1930; Heim, 1954; Chardard, 1963; Martin, 1963). On the other hand, our data agree with observations from Hurel-Py (1938) who reported very variable chromosome numbers in *V. planifolia* depending on the cell type analyzed, ranging from 2n = 13 to 32 for differentiated cells, to as many as 2n = 53 for cells producing raphides. Similarly, Nair and Ravindran (1994) reported intra-individual variations in chromosome numbers from 2n = 20 to 32 in root tip cells, with 28 being the most common. This aneuploidy may originate from the frequent somatic associations which have been observed in root tip cells of *V. planifolia* and which may be responsible for the fusion of chromosomes during cell division as observed by Nair and Ravindran (1994).

Most references document n = 16 in *V. planifolia* (Heim, 1954; Chardard, 1963; Tanaka et Kamemoto, 1984; Soto Arenas, 2003). Brandham (1999) proposed a new hypothesis n = 8 giving 4x = 32, 8x = 64 which would better explain the

observed aneuploidy around 2n = 32. This also agrees with the work of Nair and Ravindran (1994) who suggested that *V. planifolia* was an ancient autopolyploid based on their observations of mitotic associations. However, preliminary data from early stages of gamete development show haploid pollen with 16 chromosomes (data not shown), an observation that would confirm the hypothesis of Chardard (1963) or Heim (1954). This is currently being explored further, but is hampered by the need to wait for flowering. Counts from pollen grain mitosis will provide further insights into the basic chromosome number for *V. planifolia* as it overcomes the problems caused by somatic aneuploidy in aerial root cells.

A4.5.4. Polyploidy in **V. planifolia**

In our study, three groups of 2C-values were revealed in *V. planifolia*. A mean 2C-value of 5.03 pg, was found in the majority of sampled *V. planifolia* (referred to as group A) and included phenotypes from Reunion Island 'Classique', 'Mexique', 'Variegata' and 'Aiguille' as well as accessions from other areas (Central America, Costa Rica, Guatemala, Guadeloupe, Madagascar, Seychelles, French Polynesia, Samoa, Vanuatu). The 'Stérile' and 'Grosse Vanille' types from Reunion Island constituted group B and group C with mean 2C-values of 7.67 and 10.00 pg, respectively. Many reports of intraspecific variation in nuclear DNA content exist in the literature for various plant species (e.g. see reviews by (Noirot *et al.*, 2003b; Murray, 2005)). Variations at the intraspecific level can be due to (i) methodological problems (Noirot *et al.*, 2000; Noirot *et al.*, 2003a; Noirot *et al.*, 2005), (ii) heterochromatin modifications (Bennett et Leitch, 2005), (iii) differences in dye accessibility to DNA (Noirot *et al.*, 2002), (iv) taxonomic heterogeneity (Murray, 2005) or to (v) true genome size variation reflecting different ploidy levels (Garnatje *et al.*, 2006).

The correlation between mean 2C-values and mean chromosome numbers was therefore assessed to verify whether the genome size variation truly reflected variation in ploidy level within *V. planifolia*. The analysis revealed a positive correlation between 2C-values and chromosome number, with group A displaying on average 22.11 to 23.69 chromosomes, group B displaying 26.57 to 28.41 chromosomes and group C displaying 30.23 to 33.67 chromosomes. Because of the

observed somatic aneuploidy, 2C-value estimates are a better indicator of ploidy level than chromosome numbers in *V. planifolia*. If somatic aneuploidy is the result of chromosome fusions at mitosis as suggested by Nair and Ravindran (1994), this would explain why the overall 2C-values (pg) are stable. Therefore if group A at 5.03 pg is considered 'diploid', then group B with 10.00 pg might be considered 'tetraploid' and group C at 7.67 pg 'triploid'.

A4.5.5. Impact of polyploidy on morphology

The 'Sterile' and 'Grosse Vanille' phenotypes, which have been identified in crops in Reunion Island, are rarely encountered but are easily distinguished by growers. These accessions collected in the field were introduced into the CIRAD collection (three repeats each), however the vines are not yet sufficiently developed to allow reliable morphological measurements. Nevertheless, the 'Sterile' type is morphologically similar to the 'Classique' type but it is unable to produce pods after manual self-pollination (Bory *et al.*, 2007). The triploid status of the 'Sterile' phenotype could be an explanation for its self-sterility (Wilson, 1962; Johnson *et al.*, 2003; Chen et Ni, 2006). In autopolyploids, fertility of the triploids has indeed usually been found to be much lower than that of the diploids or the tetraploids (Bretagnolle et Thompson, 1995). Differences between male and female gametes, with male gametes usually sterile and female gametes partially fertile, are also reported (Bretagnolle et Thompson, 1995). Our preliminary results have shown that the rate of *in vitro* pollen germination in the 'Stérile' types is much lower than that found in the diploid 'Classique' types (data not shown). In addition, field observations have shown that pollen of the 'Sterile' type is unable to self-pollinate (as shown by withering and falling of flowers soon after self-pollination), further suggesting that the pollen is sterile (Bory *et al.*, 2007). On the other hand, observations from growers and common knowledge show that when 'Classique' pollen is used to hand-pollinate a 'Stérile' flower, then pollination is successful (Bory *et al.*, 2007). This needs to be investigated further but these preliminary observations are consistent with the suggestion that triploidy is responsible for the self-sterility trait of the 'Stérile' types. Furthermore, the 'Grosse Vanille' type exhibits bigger stems, leaves and fruits than the 'Classique'

types (Bory *et al.*, 2007), which is also consistent with the suggestion that this phenotype is a tetraploid compared with the more common 'Classique' types which are diploids.

The most immediate effect after a chromosomal doubling is an increase in cell size and a reduction in the surface/volume ratio (Stebbins, 1950). To provide further evidence of the impact of ploidy levels on morphology, stomatal sizes were measured in *V. planifolia.* Our stomatal length measurements agree with those observed by Stern and Judd (1999) who reported values ranging from 40 to 47 µm. Our data revealed three stomatal size classes which were strongly and positively correlated with both chromosome numbers and 2C DNA content. The stomatal data thus provide further evidence for the existence of intraspecific polyploidy in *V. planifolia* linked with phenotypic variations. Stomatal length measurements are therefore a good indicator of ploidy levels in *V. planifolia* as already noted for other plant groups (Przywara *et al.*, 1988; Beck *et al.*, 2003; Seidler-Lozykowska, 2003) and even fossil polyploid plants (Masterson, 1994).

A4.5.6. Origin of polyploidy in **V. planifolia**

Our results show that DNA content increases in direct proportion with increasing ploidy level (i.e. there is no loss of DNA following polyploidy). This observation may reflect the young age of the triploid ('Stérile') and tetraploid ('Grosse Vanille') accessions since *V. planifolia* was introduced into Reunion Islands less than 200 years ago.

An autopolyploid origin for the triploid ('Stérile') and tetraploid ('Grosse Vanille') accessions is suggested by the strong AFLP homogeneity of these types with the 'Classique' type (Bory *et al.*, submitted-b). Moreover, a comparative genetic study with Mexican cultivars showed that the phenotypes collected in Reunion Island were not introduced but evolved *in situ* on the island (Bory *et al.*, submitted-b).

The possible origin of these recent autotetraploid and triploid types are further discussed thereafter. In the absence of natural pollinators in Reunion Island (Bory *et al.*, 2007), autotetraploid accessions probably arose from somatic chromosomal doubling leading to somatic endopolyploidy followed by vegetative

propagation. This phenomenon is commonly encountered in plants, particularly in angiosperms (Joubès et Chevalier, 2000). Endopolyploidy could arise from endomitosis whereby mitosis takes place inside the intact nuclear envelope leading to the duplication of the chromosomes without cell or nuclear division (Joubès et Chevalier, 2000). Alternatively endopolyploidy may arise from endoreduplication of the entire genome without structural changes resembling mitosis (Geitler, 1939). Whatever the mechanism, endopolyploidy can reach very high levels in some tissues (Catrice *et al.*, 2006). In the same tissue or organ, plant cells have different ploidy levels i.e. polysomaty. Endopolyploidy might be produced as an alternative to the classical mitotic cycle to enable more rapid growth (Melaragno *et al.*, 1993). Endopolyploidy has already been described in *V. planifolia* in specialized cells such as those producing crystal idioblasts of oxalo-acetate located in the meristematic cortical area of the aerial roots (Kausch et Horner, 1984), as well as in the leaf epidermal and mesophyll cells (Stern et Judd, 1999), and in leaf epidermal cells from the present work. Somatic endopolyploidy could be the phenomenon that gave rise to the autotetraploid accessions in *V. planifolia* via vegetative propagation

Two alternative hypotheses could explain the origin of triploid accessions in Reunion Island. The first involves a cross between a tetraploid and a diploid *V. planifolia* individual (De Wet, 1980; Dvorak, 2004). The second is based on the production of unreduced gametes due to a failure in meiosis accompanied by self-pollination (Bretagnolle et Thompson, 1995; Dvorak, 2004; Tate *et al.*, 2005). The first hypothesis necessitates: (i) the occurrence of tetraploid and diploid specimens in the same area, (ii) the presence of a pollinator in this area, (iii) pollination followed by fertilization and pod formation, (iv) seed germination. The second hypothesis necessitates: (i) meiotic failure, (ii) self-fertilization and pod formation, (iii) seed germination. In the context of Reunion Island, where pollinators are absent or rare (Bory *et al.*, 2007), the second hypothesis is more probable than the first. It could have resulted from hand-pollination followed by germination of a forgotten pod. Given that a meiotic failure is relatively rare (Tate *et al.*, 2005) and the probability of successful germination is rare as well (Bory *et al.*, 2007), this could explain why only two 'Stérile' specimens (both obviously clonal) have been discovered in Reunion Island out of all the collected samples.

In all cases, it is important to underline that these autopolyploidy events are rare as only five 'Grosse Vanille' and two 'Stérile' accessions have been observed in Reunion Island despite extensive collecting, over 300 accessions, in plantations (Grisoni *et al.*, 2007). Furthermore, these autopolyploid specimens were encountered in a limited area, the forest of Mare-Longue, Saint Philippe.

A4.5.7. Conclusion and perspectives

This paper presents the first broad cytogenetic study of *V. planifolia*. Cytologically, most *V. planifolia* accessions may be considered as diploid with a 2C-value of 5 pg. We have demonstrated the recent formation (i.e. since the introduction of vanilla in 1822) of rare natural triploid and autotetraploid types in Reunion Island. This raises major questions with regards to domestication of vanilla via vegetative reproduction. The extensive vegetative propagation used in cultivation practices might be an important factor that increases the frequency of autopolyploidization, particularly through endopoplyploidy. It will be very important to assess whether such chromosomal abnormalities can also be found in *V. planifolia* in natural conditions or in other cultivation areas. Interestingly, the existence of a self-sterile type is also reported in cultivation in Mexico, named 'Oreja de Burro' (Bory *et al.*, 2007). 'Oreja de Burro' showed a totally different AFLP pattern from the 'Stérile' type from Reunion Island (Bory *et al.*, submitted-b) suggesting that the self-sterility trait has arisen independently in each area. It will be essential to assess whether the sterility trait in the 'Oreja de Burro' type is also due to triploidy.

The existence of diploid, triploid (self-sterile) and tetraploid cytotypes, offers a model of choice to determine the origin and the morphological, genetic and epigenetic consequences of this recent autopolyploidization event. Indeed, in a recent review of the epigenetic impact of allopolyploidization, Grant-Downtown and Dickinson (2006) stressed that most studies are made on allopolyploids, and that there is a crucial lack of studies on autopolyploids. Yet such a study would allow the impact of ploidy changes on the genome (both genetic and epigenetic) to be evaluated without adding the complicating factor of the juxtaposition of two different genomes (as in allopolyploids).

Vegetative propagation is the predominant mode of reproduction in *Vanilla* in natural conditions (Bory *et al.*, 2007). However, there is also increasing evidence that the evolution of the genus has involved interspecific hybridization (Nielsen et Siegismund, 1999; Nielsen, 2000). As reported by Hieter and Griffith (1999), polyploidy is favoured in perennial plants having modes of asexual reproduction and in plants where natural interspecific hybridizations occurred. Polyploidization (either auto or allo) might therefore be an important evolutionary mechanism in the genus *Vanilla* that will need to be taken into account in further phylogenetic and taxonomic studies.

Acknowledgements

This study was supported by the Bureau des Ressources Génétiques (AP 2003-2004), the Conseil Régional of Reunion Island and the European Social Fund (Allocation Régionale de Formation Doctorale to Séverine Bory 2004-2007).
We thank Pr A. Charrier (SupAgro, Montpellier), Dr M. Fay and Pr M. Chase (Jodrell Laboratory, Kew), P. Lubinsky (UCR, California), and M. Wong and S. Andrzejewski (EVT, Uturoa) for their advice and helpful discussions, Dr M. Noirot (IRD, La Réunion) for his help in data analyses as well as Pr M. Dron (IBP, Univ. Paris XI) and Dr P. Feldmann (CIRAD, Montpellier) for their interest and support to this work.

Article N°5 :

Vanilla pompona (Orchidaceae) is an ancient polyploid species

Séverine BORY [1,4] - Olivier CATRICE [2] - Spencer BROWN [2] - Ilia J. LEITCH [3] - Rodolphe GIGANT [4] - Frédéric CHIROLEU [1] - Michel GRISONI [1] - Marie-France DUVAL [5] - Pascale BESSE [4]

[1] CIRAD, UMR PVBMT Cirad - Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

[2] Groupe "Dynamique de la compartimentation cellulaire", Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR 2355, bât 23/24, 91198 Gif-sur-Yvette, France

[3] Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3DS, UK

[4] Université de La Réunion, UMR PVBMT Cirad - Université de La Réunion, 15 avenue René Cassin, BP 7151, 97715 Saint Denis messag cedex 9, La Réunion, France

[5] CIRAD, UPR Multiplication Végétative, Boulevard de la Lironde, TA A-75/02, 34398 Montpellier cedex 5, France

En préparation pour :

Annals of Botany

Mots clés : aneuploïdie, nombre chromosomique, quantité d'ADN, cytométrie en flux, taille du génome, morphologie, polyploïdie, stomates, *Vanilla pompona*

Résumé

La polyploïdie est un paramètre clé dans l'évolution des plantes, comme il a été récemment démontré pour l'espèce *Vanilla planifolia*. En raison de ses caractéristiques morphologiques, l'espèce *V. pompona* est soupçonnée d'être polyploïde. Cette hypothèse a été testée avec des estimations de la quantité d'ADN nucléaire, des comptages chromosomiques, et l'impact de la polyploïdie sur la morphologie (incluant les longueurs de stomates) a été vérifié. La quantité d'ADN nucléaire de dix-huit accessions de l'espèce *V. pompona*, précédemment

caractérisée par des marqueurs AFLP, a été recherchée par cytométrie en flux. Des comptages chromosomiques dans les cellules de racines aériennes, des mesures de longueurs de stomates et des mesures morphologiques ont été réalisées sur un sous-échantillon de ces accessions. Comme il a été précédemment observé pour *V. planifolia, V. pompona* montre une forte aneuploïdie somatique dans les cellules racinaires, ainsi que de l'endoréplication révélée par cytométrie en flux. Les valeurs 2C pour *V. pompona* s'échelonnent de 8.18 pg à 10.72 pg. Les longueurs de stomates montrent une variation significative de 44.44 µm à 54.49 µm. Les nombres chromosomiques varient de 10 à 68 chromosomes par cellule. Par comparaison avec les autotétraploïdes récents de *V. planifolia*, ceci indique que *V. pompona* pourrait être une espèce polyploïde, probablement tétraploïde. Deux groupes sont révélés parmi les *V. pompona* (aussi bien génétiques, que phénotypiques et cytogénétiques) et les nombres chromosomiques et les tailles de stomates montrent des relations négatives avec les valeurs 2C. Cet article est la première étude mettant en évidence que *V. pompona* est un ancien tétraploïde qui pourrait avoir évolué par le biais de fusions de chromosomes (pour les accessions à 10-11 pg avec un nombre chromosomique médian d'environ 19) ainsi que par le biais d'une contraction génomique (pour les accessions à 8-9.5 pg avec un nombre chromosomique médian de 26 à 36), en fonction des groupes génétiques sub-spécifiques présents dans ce complexe d'espèces.

A5.1. Abstract

Background and aims

Polyploidy is a key parameter in plant evolution, as demonstrated recently for the species *Vanilla planifolia*. Based on its morphological characteristics, the species *V. pompona* was suspected to be a polyploid. This hypothesis was tested with DNA content estimations, chromosome counts, and the impact of polyploidy on morphology (including stomatal lengths) was verified.

Methods

The nuclear DNA content of eighteen accessions of the species *V. pompona* previously characterized using AFLP markers was assessed by flow cytometry. Chromosome counts in aerial root tip cells, stomatal length and morphological measures were made on a sub-sample of these accessions.

Key results

As previously observed for *V. planifolia, V. pompona* exhibited a strong somatic aneuploidy in root cells, as well as endoreduplication revealed by flow cytometry. The 2C-values for *V. pompona* ranged from 8.18 pg to 10.72 pg. The stomatal length showed a significant variation from 44.44 µm to 54.49 µm. Chromosome numbers varied from 10 to 68 chromosomes per cell. Based on a comparison with recent autotetraploid *V. planifolia*, this indicates that *V. pompona* might be a polyploid species, most likely tetraploid. Two groups (genetic, phenotypic and cytogenetic) were revealed within *V. pompona* and chromosome numbers and stomatal sizes showed negative relationships with 2C-values.

Conclusions

This is the first evidence that *V. pompona* may be an ancient tetraploid which might have evolved through chromosome fusions (for the 10-11 pg accessions with a median chromosome number around 19) as well as genome downsizing (for the 8-9.5 pg accessions with 26 to 36 median chromosome numbers), depending on the sub-specific genetic groups present in this species complex.

A5.2. Introduction

Vanilla pompona Schiede (Orchidaceae) is an aromatic species found in Central America. It is grown locally or harvested in the wild (Bory *et al.*, 2007). *V. pompona* is characterized by large leaves and thick stems, as well as large trigonal fruits, and is sometimes referred to 'big vanilla' (in French Guyana) or 'vanilla boffa' (swollen vanilla) (Portères, 1954). Given that rare and recent polyploidization events were detected in *V. planifolia,* the main cultivated *Vanilla* species (Bory *et al.*, submitted-a), as well as in *V. tahitensis* (Duval *et al.*, 2006), we investigated whether *V. pompona* could be a polyploid species, as it presents morphological characteristics similar to that of autotetraploid 'Grosse Vanille' accessions of *V. planifolia* (Bory *et al.*, 2007; Bory *et al.*, submitted-a). Polyploidy is one of the most significant mechanisms of evolution and speciation in plant (Stebbins, 1950; Grant, 1981) with major ecological consequences (Lewis, 1980). It could represent as well a major mechanism in the evolution of the *Vanilla* genus (Bory *et al.*, 2007). Previous reports on *V. pompona* indicated a 2C-value of 14.45 pg (Jones *et al.*, 1998) and 2n = 32 (Heim, 1954; Martin, 1963). These values are similar to the ones published by the same authors for diploid *V. planifolia* and did not favor a polyploid origin for *V. pompona.* However, as recent 2C-value determinations for *V. planifolia* demonstrated the discrepancy of values reported in the literature (Bory *et al.*, submitted-a), this was further investigated.

The aim of this study was therefore to analyze the nuclear 2C-values and chromosome numbers as well as morphological characters (vegetative characters and stomatal length) in geographical diverse accessions of *V. pompona*. These were selected as a representative sub-sample of a larger number of accessions previously studied using AFLP markers (Bory *et al.*, submitted-b). This paper presents the first broad cytogenetic study on the species *V. pompona*.

TABLE 1: Code, place of origin of *V. pompona* and results for each analysis.

			Flow cytometry		Chromosome counts		Stomatal length	
Code [1]	**Place of origin**	**AFLP group**	**Mean 2C pg (± s.d.)** [2]	**Number of leaves**	**Median number** [3]	**Number of cells**	**Mean length (± s.d.)** [3]	**Number of stomata**
PO0018	French Polynesia	A	10.72 (± 0.30) [i]	2	20 [b]	81	49.83(± 2.27) [bc]	30
PO0064	Botanical Garden (France)	A	10.15 (± 0.19) [hi]	2			44.44(± 5.32) [a]	20
PO0152	Botanical Garden (France)	A	9.79 (± 0.15) [gh]	3	18 [a]	207	44.97(± 3.65) [a]	30
PO0691	Botanical Garden (France)	A	10.04 (± 0.10) [gh]	2			47.58(± 3.11) [ab]	30
PO0070	Brazil	B	8.18 (± 0.15) [a]	2	36 [e]	31	53.17(± 2.93) [de]	30
PO0096	French Guyana	B	8.89 (± 0.08) [bcde]	2			53.92(± 2.60) [e]	30
PO0680	French Guyana	B	8.52 (± 0.12) [abc]	2	30 [cd]	14	51.33(± 2.84) [cd]	30
PO0681	French Guyana	B	8.82 (± 0.07) [bcd]	2				
PO0046	Guadeloupe	B	8.97 (± 0.31) [cdef]	2			51.83 (± 3.28) [cde]	30
PO0047	Guadeloupe	B	9.45 (± 0.16) [efg]	2			51.58(± 2.41) [cd]	30
PO0048	Guadeloupe	B	8.35 (± 0.18) [ab]	2	32 [d]	123		
PO0052	Guadeloupe	B	9.50 (± 0.19) [fg]	3			54.49 (± 4.11) [e]	30
PO0030	Reunion Island	B	9.54 (± 0.08) [fg]	2				
PO0031	Reunion Island	B	8.92 (± 0.03) [bcde]	2				
PO0620	Reunion Island	B	9.08 (± 0.24) [def]	3	32 [d]	42	54.17 (± 3.68) [e]	30
PO0633	Reunion Island	B	9.54 (± 0.19) [fg]	2	32 [d]	52	54.08 (± 2.97) [e]	30
PO0639	Reunion Island	B	8.95 (± 0.28) [cde]	3	26 [c]	70		
PO0708	Reunion Island	B	9.05 (± 0.17) [cdef]	2				

[1] The number corresponds to the accession number in the CIRAD collection.

[2] Mean values with different letters are significantly different according to Student *t*-test at level 0.05.

[3] Median values with different letters are significantly different according to Wilcoxon rank sum test at level 0.05.

A5.3. Material and methods

A5.3.1. Plant material

The 18 accessions of *V. pompona* studied comprise samples from different geographical origins (Table 1). Accessions have been chosen according to their genetic differentiation as determined by AFLP markers (Bory *et al.*, submitted-b). Different groups with strong bootstrap values (100%) were revealed in relation with the geographical origin of the spontaneous accessions collected in *V. pompona*'s area of natural dispersion (Guadeloupe, French Guyana, Brazil and other American origins) and areas of introduction (Reunion Island and French Polynesia). These genetic groups are summarized in Table 1.

Samples were collected from vines maintained in the collection of vanilla genetic resources of CIRAD in Reunion Island (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) (Grisoni *et al.*, 2007). Entire leaves were collected for flow cytometry analyses and stomatal lengths measurements and aerial root tips were harvested for chromosome counts. Full details of each accession (e.g. place of origins and types of analyses) are presented in Table 1. At least one accession from each main genetic AFLP group (A or B) was used for further cytogenetic and morphological analyses, depending on plant material availability (Table 1).

A5.3.2. Cytogenetic analyses

Determination of 2C DNA content by flow cytometry was performed on the 18 *V. pompona* accessions with two to three repeats per accession, as described previously by Bory *et al*. (submitted-a), using wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring (2C = 30.9 pg; 43.7% GC) as the internal calibration standard. Chromosome counts from aerial root tips were made for eight *V. pompona* accessions with various 2C-values as described by Bory *et al*. (submitted-a).

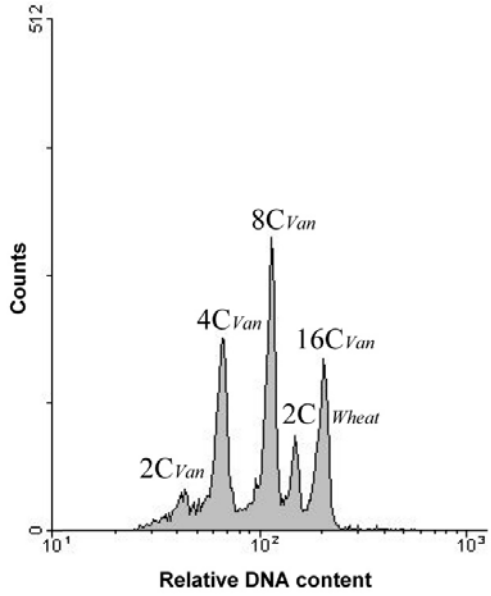


FIG. 1: Histogram from flow cytometry showing endoreplication for *V. pompona* PO0691, and the internal standard wheat. The abscissa is a log scale of relative intensity in propidium iodide stained nuclei.

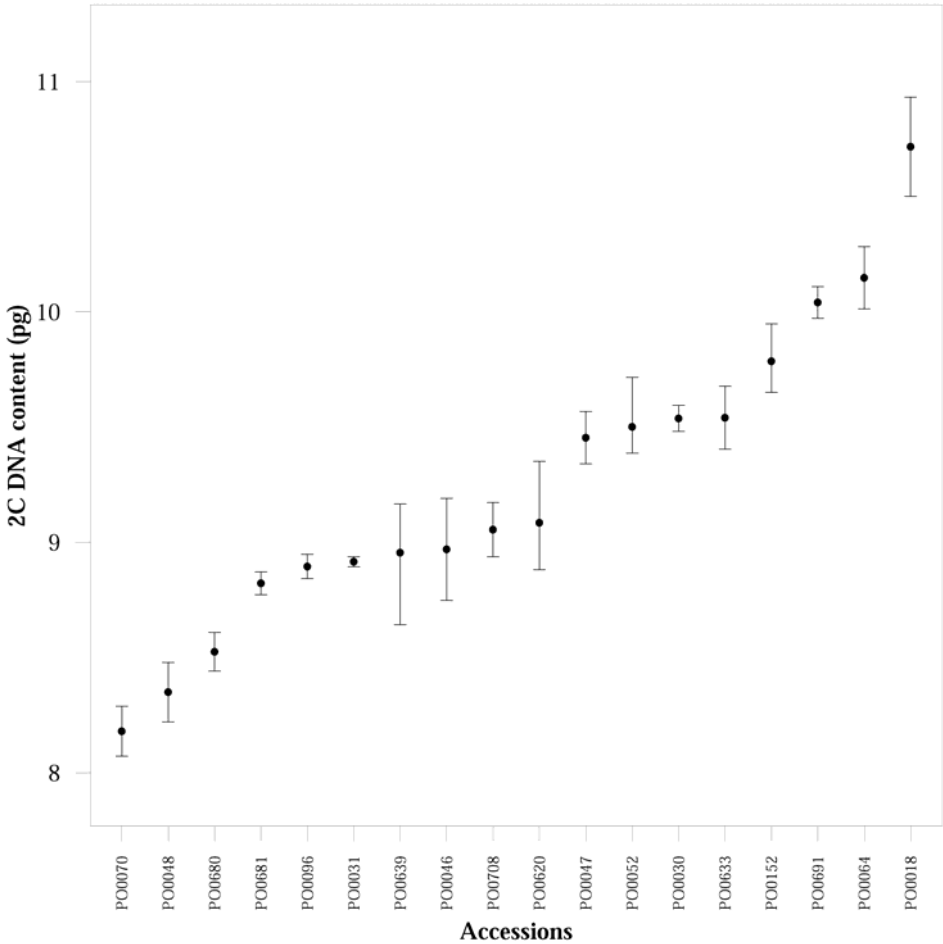


FIG. 2: Graph showing the 2C DNA contents for 18 *V. pompona* accessions, estimated by flow cytometry. Points represent means and whiskers represent the data range.

A5.3.3. Morphological analysis

Morphological measures were made for 11 accessions maintained in the CIRAD collection, and that were mature plants (2-3 years old) comprising vigorous shoots. Quarantined or too young plants were not included. Five parameters were measured: width at 43 mm from apex ("wt"), maximal width ("wm"), maximal length ("L") of the leaves of rank 4 to 7; length ("in") and diameter ("D") of internodes 4 to 7. Measures were realized on one to three plants per accession, two to four shoots per plant and four leaves per shoot. Three additional variables were calculated from these measures in order to increase discrimination between accessions: product ("Lwm") and ratio ("Llwm") of maximal length/maximal width of the leaf and ratio maximal width/width at apex of the leaf ("wmlwt").

Stomatal lengths were measured for 12 *V. pompona* accessions using three mature leaves per plant. One cm^2 of epidermis of the lower leaf surface was removed and placed on a slide. Stomatal size was determined by measuring the guard cell length. A random sample of ten stomata was measured for each leaf on a microscope Leitz DM RBE (Leica, Wetzlar, Germany).

A5.3.4. Data analysis

Data were analyzed using R software for windows (version 2.5.1; (R Development Core Team, 2006), Vienna, Austria). Effect of origin was tested by ANOVA at level 0.05 for 2C-values from flow cytometry. A pairwise mean comparison Student's *t*-test at level 0.05 was used to compare means with the p-value adjustment method of Benjamini & Yekutieli (2001). Effect of origin was tested for chromosome counts on one hand and for stomatal lengths on the other hand by pairwise comparison Wilcoxon rank sum tests at level 0.05 with the p-value adjustment method of Benjamini & Yekutieli. A principal component analysis (PCA) was also carried out to show multiple dimensions of the phenotypes distribution. A hierarchical clustering was made to group accessions (Gordon, 1999) based on combined 2C-values, chromosome counts and stomatal sizes. Two distances (Euclidean and Manhattan) were used to construct the dissimilarities matrix and

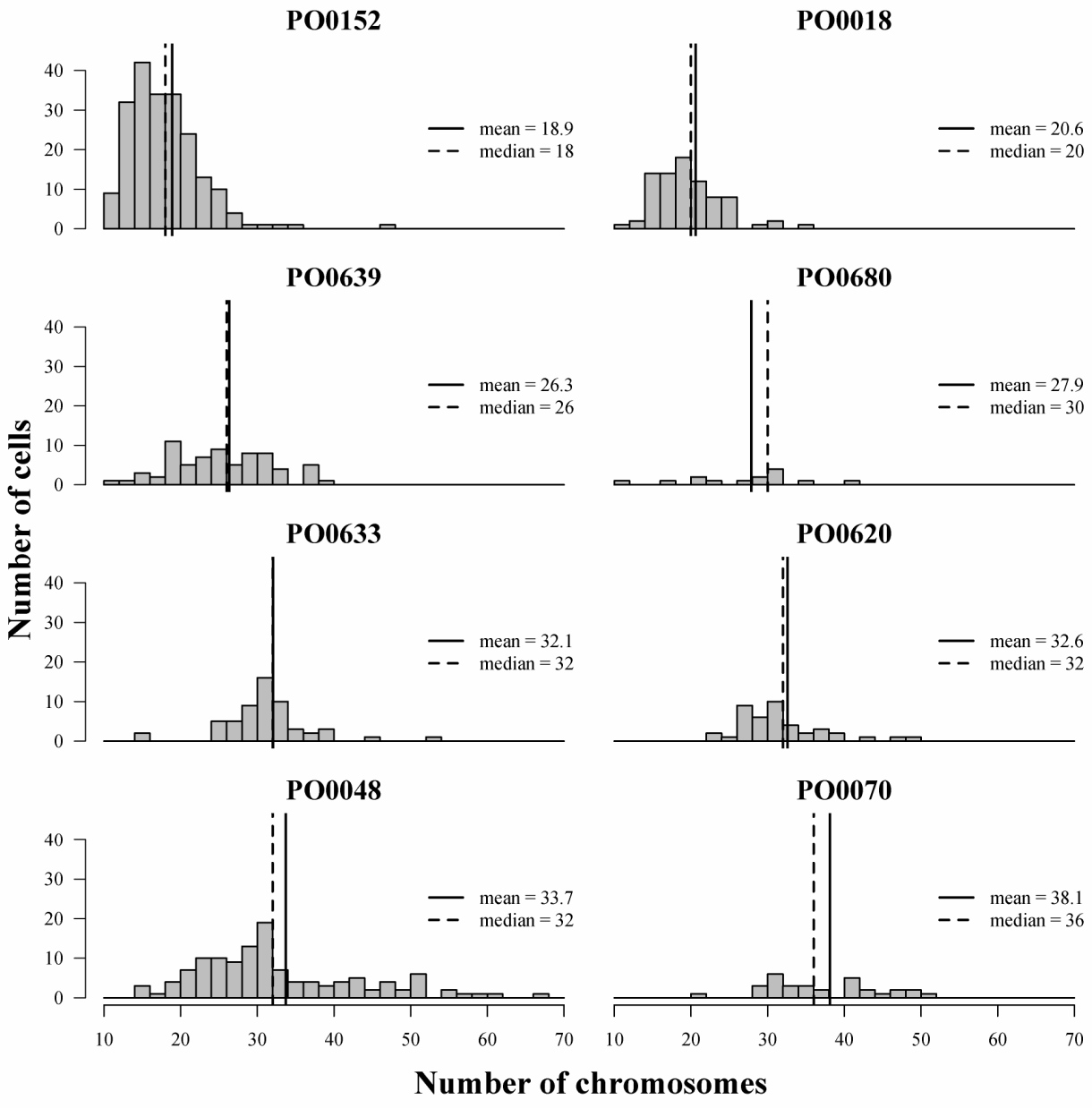


FIG. 3: Graphs showing the range and frequency of chromosomes numbers obtained for eight *V. pompona* accessions. Mean chromosome number is represented by a solid line and median by a dotted line.

two methods of agglomeration were used to construct the trees ("average", "mcquitty").

A5.4. Results

A5.4.1. Flow cytometry

Holoploid genome sizes i.e. nuclear 2C-value (as defined by (Greilhuber *et al.*, 2005)) were obtained for the 18 accessions of *V. pompona* with two to three repeats per accession (Table 1). Fluorescence histograms revealed endoreplication resulting in 4 to 5 peaks that correspond to 2C, 4C, 8C, 16C and 32C nuclei (Fig. 1). The marginal replication ratio, which is the ratio between each peak position, was irregular with 1.5, 1.7 and 1.8 (instead of 2) within each histogram but this sequence was constant between all accessions despite protocol changes (data not shown).

V. pompona had 2C-values ranging from 8.18 (± 0.15) to 10.72 pg (± 0.30) (Fig. 2). The coefficients of variation within accessions did not exceed 3.5%. Student's *t*-test showed that accessions were not grouped but that they present a continuum of 2C DNA content (Table 1, Fig. 2).

A5.4.2. Determination of chromosome number

Chromosome numbers were counted for eight accessions of *V. pompona* representative of the various 2C-values obtained (Fig. 3). There was a large intra-individual and intraspecific variation in the chromosome numbers (from 10 to 68 chromosomes per cell). Pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test at level 0.05 showed that: (i) accessions PO0152 and PO0018 displayed median chromosome numbers significantly lower (18 and 20 chromosomes) than other accessions; (ii) accessions PO0633, PO0620 and PO0048 were not significantly different from each other, with 32 median chromosome numbers; (iii) accession PO0680, exhibiting median chromosome numbers of 26 was not significantly different from the three previous accessions on one hand, and from PO0639 on the other hand (26 chromosomes) (Table 1, Fig. 3); (iv) accession PO0070 displayed significantly higher

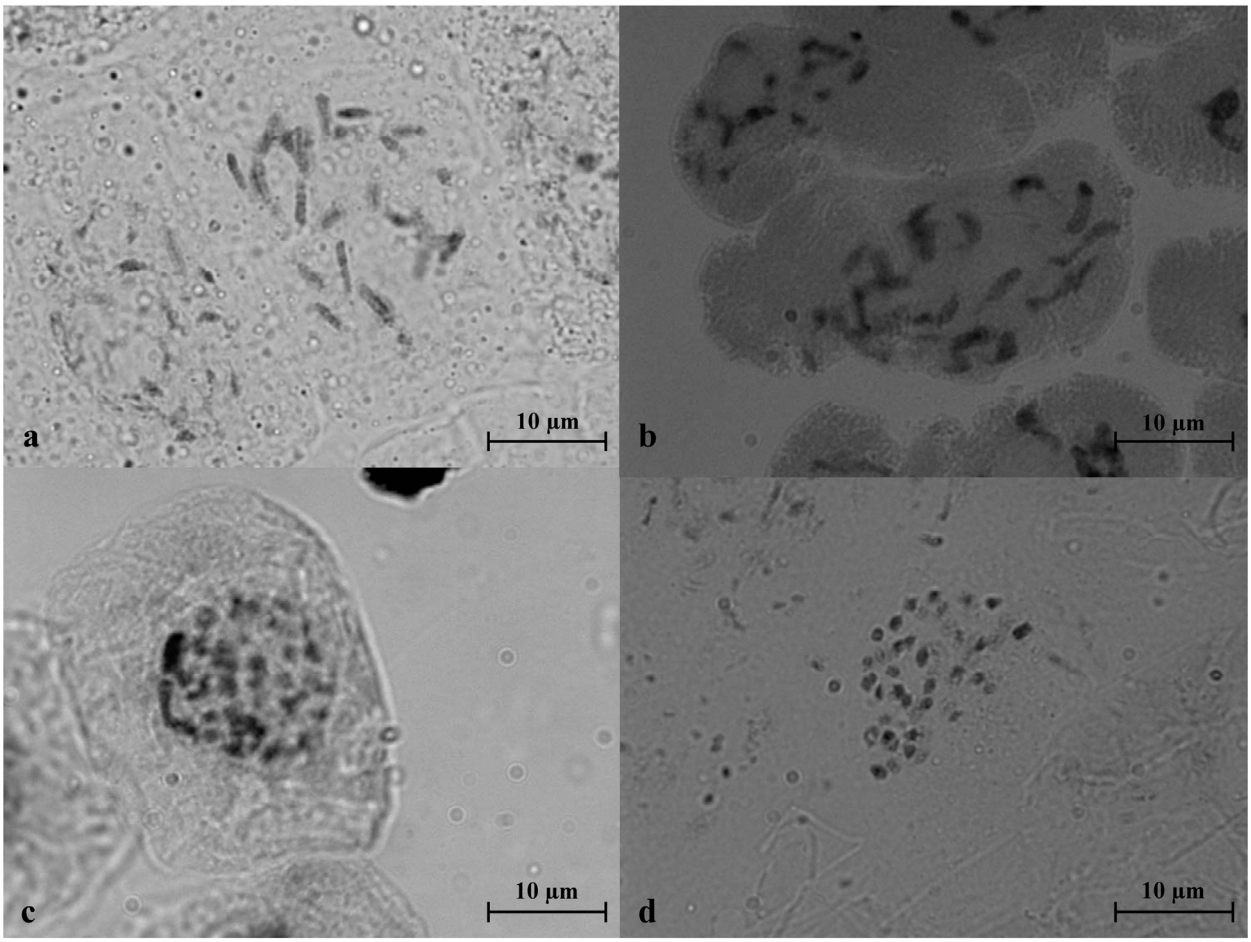


FIG. 4: Metaphase plates showing differences in size and number of *V. pompona* chromosomes. (a)-(b) Big size of chromosomes for PO0018 (22 chromosomes) and PO0152 (24 chromosomes). (c)-(d) Small size of chromosomes for PO0633 (32 chromosomes) and PO0070 (42 chromosomes). Bar represents 10 µm.

chromosomes (36) than other accessions. The two accessions with small chromosome numbers PO0018 and PO0152 were characterized by bigger chromosomes than other accessions (Fig. 4).

A5.4.3. Measure of stomatal length

Stomatal lengths were measured for 12 *V. pompona* accessions. Thirty stomata were measured for each accession except for PO0064 which did not have three mature leaves. The mean lengths of stomata in *V. pompona* were relatively homogenous ranging from 44.44 µm to 54.49 µm (Table 1). Pairwise comparison using Wilcoxon rank sum test at level 0.05 showed that: (i) accessions PO0064 and PO0152 had significantly shorter stomatal length (inferior to 45 µm) than other accessions; (ii) all other accessions form a continuum of stomatal lengths with on one hand accessions PO0691 and PO0018 having short stomata (inferior to 50 µm) and on the other hand accessions PO0680, PO0047, PO0046, PO0070, PO0096, PO0633, PO0620 and PO0052 with stomatal lengths comprised between 51 µm and 55 µm (Table 1).

A5.4.4. Morphological analysis

The three first axes of the principal component analysis explained 81.8% of the total variation with each contributing 44%, 23.9% and 13.9% respectively, of the morphological *V. pompona* variability (Fig. 5). Variable “L” was strongly negatively correlated with axis 1 which therefore represented a gradient of leaf length. All variables were negatively correlated with axis 1 except variable “wt”. If the leaf will increase in length the width will decrease. Accession PO0018 was distinctly separated from the other accessions.

This result is consistent with the fact that two phenotypes have been observed in accessions of *V. pompona* collected in the field (Brazil, Guadeloupe, French Guyana, French Polynesia and Reunion Island) or obtained by exchange with botanical gardens. Accession PO0018 (from French Polynesia) has a morphological type (A) characterized by short internodes, short and large cardioid leaves. Accessions PO0152, PO0691 and PO0064 could not be measured as they were

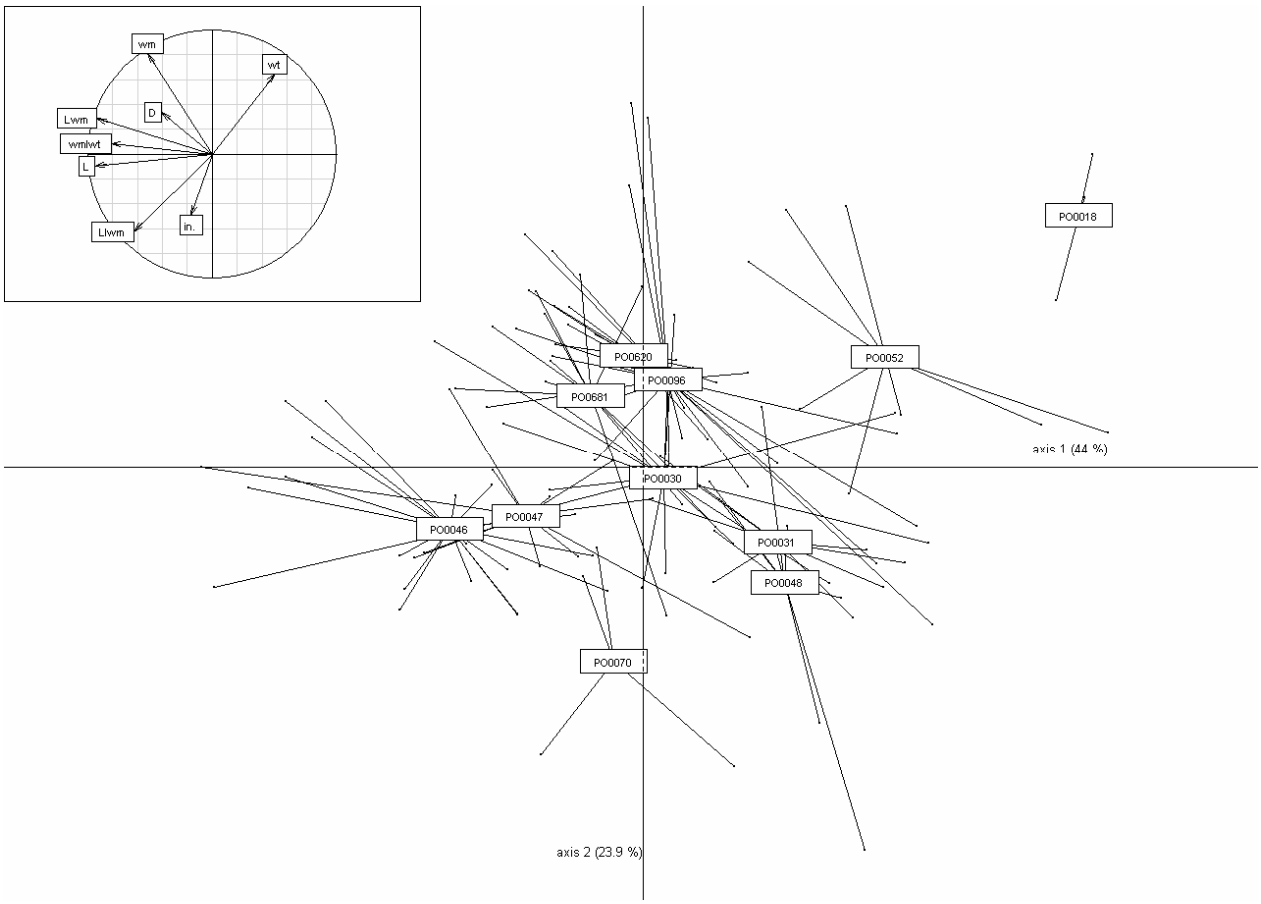


FIG. 5: Principal component analysis on morphological characters according to axis 1 and 2. Axis 1 represents 44% and axis 2 23.9% of the morphological variations. The correlation circle of variables used for the PCA is shown.

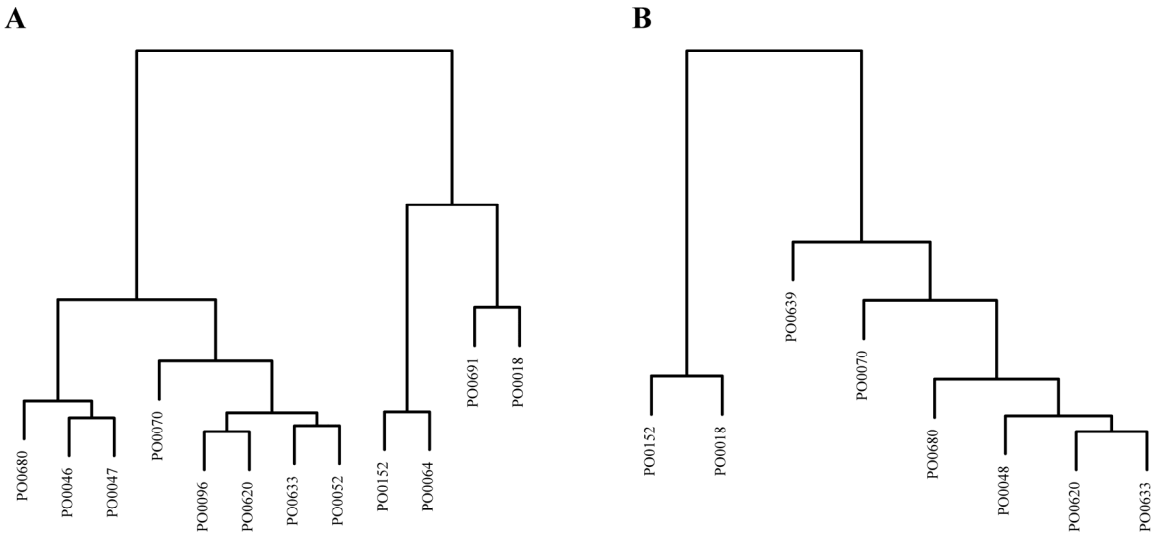


FIG. 6: Agglomerative clustering of *V. pompona* accessions using Euclidean distance and average method of agglomeration on: (A) mean 2C-values and mean stomatal lengths for 12 accessions; (B) mean 2C-values and median chromosome numbers for eight accessions.

quarantined and not fully developed, but they present also the same morphological characteristics as type A (data not shown). All other accessions have a morphological type (B) characterized by long internodes, long and thin lanceolate leaves. Regarding phenology, accessions PO0018, PO0064, PO0152 and PO0691 have a flowering period from September to October in the CIRAD collection in Reunion Island while other accessions have a flowering period from end of November to January.

A5.4.5. Hierarchical clustering of **V. pompona** *accessions*

Hierarchical clustering of *V. pompona* accessions was performed using mean for 2C-values and stomatal lengths and median values (which is a more robust estimator than mean values) for chromosome numbers. Accessions were separated in two distinct groups (Fig. 6) whatever the distance (Euclidean or Manhattan) and the methods of agglomeration ("average" or "mcquitty") used. When the classification was made using mean 2C-values and stomatal lengths together, accessions PO0018, PO0691, PO0064 and PO0152 were separated from the other eight accessions (Fig. 6). When the classification was made using mean 2C-values and median chromosome numbers, accessions PO0018 and PO0152 were separated from the other six accessions (Fig. 6). For the classification with mean 2C-values, mean stomatal length and median chromosome numbers, accessions PO0018 and PO0152 were separated from the other four accessions (data not shown). This therefore indicated, with all data taken together (2C-values, chromosome numbers and stomatal length) that accessions may be divided in two groups: group A comprising accessions PO0018, PO0152, PO0691, PO0064 and group B comprising the remaining *V. pompona* accessions.

A5.5. Discussion

A5.5.1. 2C DNA content in **V. pompona**

Mean 2C-values in *V. pompona* accessions ranged from 8.18 pg to 10.72 pg. As it was observed for *V. planifolia* (Bory *et al.*, submitted-a), there was little agreement between DNA 2C-values found for *V. pompona* in this study and DNA 2C-values given in the literature. With flow cytometry, Jones *et al*. (1998) indicated a 2C-value of 14.45 +/- 0.71 pg for *V. pompona*. The reasons for this discrepancy were previously discussed (Bory *et al.*, submitted-a) and included the inappropriate choice of animal cells as calibration standard which may have contributed to the different genome size reported by Jones *et al*. (1998) for *V. pompona* as they used chicken erythrocyte nuclei (2C = 2.33 pg). Our data were confirmed by other genome size estimates for *V. pompona* made using different plant cell standards with similar genome sizes as the standard used by Jones *et al*. (1998): *Petunia hybrida* (Hort.) PxPc6, 2C = 2.85 pg and *Lycopersicon esculentum* Mill, cv. Roma, 2C = 1.99 pg (Brown *et al.*, 2007).

The isolation and identification of whole 2C sample nuclei is an other potential source of error (Price et Johnston, 1996). We have observed background noise in our analyses with flow cytometry which contained cell debris and it was difficult to detect first peak (Fig. 1). Moreover, Arumuganathan and Earle (1991a) mentioned that leaves of some plants like strawberry, cocoa, mango and papaya produced a mucilaginous substance in the solution during chopping giving poor yields of nuclei, and that was the case for *V. pompona*. If the first 2C peak was missed in Jones *et al*. (1998) study, and given the 1.5 ratio between the first (2C) and second (4C) peaks observed, this would give a correction to 9.33 pg, and this would be consistent with our own results.

We therefore propose that 2C-values for *V. pompona* should be rectified to 8-11 pg.

A5.5.2. Somatic aneuploidy and chromosome numbers in **V. pompona**

Chromosome counts on aerial root tips revealed important intra-individual variations (Fig. 3) indicating a high frequency of aneuploidy in the somatic cells studied as it was also previously observed in *V. planifolia* (Hurel-Py, 1938; Nair et Ravindran, 1994; Bory *et al.*, submitted-a). This could be the result of chromosome fusions through mitosis, as suggested for *V. planifolia* (Nair et Ravindran, 1994; Bory *et al.*, submitted-a). Most of the surveyed accessions had median chromosome numbers ranging from 2n = 26 to 36 with some accessions displaying up to 2n = 68 chromosomes. These values are superior to what was found for diploid *V. planifolia* (Bory *et al.*, submitted-a) but are similar to what was observed for polyploid *V. planifolia*. The references indicating that *V. pompona* has 2n = 32 chromosomes are therefore questioned (Heim, 1954; Martin, 1963). Moreover, preliminary data on early stages of gamete development show haploid pollen with n = 32 chromosomes (data not shown), an observation that would confirm the tetraploid status of *V. pompona*. This is being explored further, but is currently hampered by the need to wait for flowering. Counts from pollen grain mitosis will provide further insights into the basic chromosome number for *V. pompona* as it overcomes the problems caused by somatic aneuploidy in aerial root cells.

A5.5.3. **V. pompona***: a polyploid species*

As opposed to the case of *V. planifolia* (Bory *et al.*, submitted-a), 2C-values could not be separated in groups. There was a continuum of mean 2C-values from 8.18 pg to 10.72 pg. These values are in the same order of magnitude than the ones revealed for triploid (7.67 pg) and tetraploid (10 pg) *V. planifolia* (Bory *et al.*, submitted-a). This therefore indicates that *V. pompona* might be considered as a polyploid species. To assess the impact of polyploidy on morphology, stomatal sizes were measured in *V. pompona.* Data obtained revealed two accessions with short stomata (44-45 µm) as well as a continuum of stomatal lengths from 47.5 µm to 54.5 µm. This is consistent with values reported by Stern and Judd (1999) ranging from 50 to 60 µm for *V. pompona*. These sizes are on average superior to the sizes revealed for tetraploid *V. planifolia* (47-48 µm) (Bory *et al.*, submitted-a) therefore

confirming the polyploid status of *V. pompona*, as stomatal lengths were shown to be a good indicator of ploidy levels (Bory *et al.*, submitted-a).

Reproduction of *V. pompona* and other *Vanilla* species in natural conditions is a mixture of vegetative and sexual reproduction (Bory *et al.*, 2007; Bory *et al.*, submitted-b). Therefore, the polyploid status of *V. pompona* could have originated from endopolyploidy in somatic cells, as discussed earlier for vegetatively propagated *V. planifolia* (Bory *et al.*, submitted-a) but it could also be the result of non-gametic reduction (Bretagnolle et Thompson, 1995; Dvorak, 2004; Tate *et al.*, 2005) leading to polyploidy through sexual reproduction in natural conditions.

A5.5.4. Two groups (genetic, phenotypic, and cytogenetic) are revealed in **V. pompona**

There was clearly two groups of different morphology (Fig. 5) and phenology within the surveyed *V. pompona* accessions. This was consistent with the genetic variations revealed using AFLP markers (Table 1 and (Bory *et al.*, submitted-b)). Genetic and morphological data separated the accessions in two groups, group A including PO0064, PO0152 and PO0691 (from unknown American origin) and the PO0018 (French Polynesia), and group B including the remaining accessions (from Brazil, Guadeloupe, French Guyana and Reunion Island).

With hierarchical clustering (based on mean 2C-values, median chromosome numbers and mean stomatal length), the accessions belonging to the phenotypic and genetic type A were clearly separated from the other accessions (type B) (Fig. 6). Thus, there are clearly two groups of *V. pompona* accessions that can be differentiated based on morphology, genetics and cytogenetics.

A5.5.5. Different behaviour between **V. planifolia** *and* **V. pompona**

Surprisingly, the accessions with small 2C-values (inferior to 9.5 pg) were characterized by a high number of chromosomes (superior to 30) and long stomata (superior to 51 µm) while the accessions with high 2C-values (superior to 9.7 pg) had a much lower number of chromosomes (inferior to 20) and smaller stomata (inferior to 50 µm) (Table 1). There is thus a negative relationship between 2C DNA

content and chromosome numbers as well as stomatal sizes within *V. pompona*. This contrasts with results obtain for *V. planifolia* where 2C DNA content increased in direct proportion with chromosome numbers and stomatal lengths witnessing recent polyploidization events (Bory *et al.*, submitted-a).

The four *V. pompona* accessions of group A have on average 2C-values of 10 pg (between 9.79 to 10.72 pg). Based on the *V. planifolia* recent tetraploid model, 30-34 chromosomes were expected for 10 pg. However, these *V. pompona* accessions exhibited a much smaller median chromosome number than expected (18-20). These accessions could be ancient polyploids, most likely tetraploids that have been subjected to important chromosomal fusions. This hypothesis is supported by the fact that the chromosomes observed are longer than in the other accessions from group B (Fig. 4).

The 15 remaining *V. pompona* accessions belonging to group B exhibited chromosome numbers (26-36) similar to tetraploid *V. planifolia* (30-34). However, the 2C DNA content was inferior (8.18 to 9.54 pg) to the one of recent tetraploid *V. planifolia* (10 pg). This indicates that these accessions might be ancient polyploids, most likely tetraploids, that have been subjected to loss of DNA leading to a decrease in total DNA content, a phenomenon called genome downsizing or genomic contraction (Leitch et Bennett, 2004). The decrease in DNA content in ancient polyploids is a widespread phenomenon and has been reported in numerous plant genera (Leitch et Bennett, 2004; Siljak-Yakovlev *et al.*, 2005; Pecinka *et al.*, 2006). Major mechanisms of genome downsizing following polyploid formation have only recently come to light (Bennett et Leitch, 2005). There are unequal recombination, illegitimate recombination, loss of DNA during the repair of strand breaks (Bennett et Leitch, 2005), deletion processes (Bennetzen *et al.*, 2005), partial elimination of repetitive DNA sequences (Greilhuber, 2005) and they remain poorly understood (Tate *et al.*, 2005).

A5.5.6. Conclusion and perspectives

This paper presents the first broad cytogenetic study on the species *V. pompona* and is the first work revealing that this species is an ancient polyploid, possibly tetraploid, with 2C-values of 8 to 11 pg, varying negatively with

chromosome numbers and stomatal lengths. Two groups of cytogenetic, phenotypic and genetic accessions were identified. The species *V. pompona* shows a large area of natural distribution (Trinidad, South-East of Mexico, Nicaragua, Panama, Colombia, Venezuela, Ecuador, Bolivia, Brazil, French and Dutch Guyana, Paraguay, Martinique and Guadeloupe (Portères, 1954)). It has been proposed that *V. pompona* should rather be considered as "species complex", including also species referred to *V. pseudopompona* and *V. grandiflora* (Soto Arenas, 1999b). The two groups revealed in this study with different cytological evolutionary patterns confirm this hypothesis. We therefore recommend that further combined cytogenetics, genetic and morphological analyses are needed to help precise the taxonomic status of this species. We further anticipate that polyploidy might be an essential process in the evolution of the *Vanilla* genus.

Acknowledgements

This study was supported by the Bureau des Ressources Génétiques (AP 2003-2004), the Conseil Régional of Reunion Island and the European Social Fund (Allocation Régionale de Formation Doctorale to Séverine Bory 2004-2007).
We thank Pr A. Charrier (SupAgro, Montpellier), Dr M. Fay and Pr M. Chase (Jodrell Laboratory, Kew) for their advices and helpful discussion, Dr M. Noirot (IRD, La Réunion) for their help in data analyses as well as Pr M. Dron (IBP, Univ. Paris XI) and Dr P. Feldmann (CIRAD, Montpellier) for their interest and support to this work.

II. Analyse cytogénétique des autres espèces du genre *Vanilla*

II.1. Introduction

L'objectif de cette troisième partie est d'analyser la quantité d'ADN nucléaire et le nombre chromosomique chez d'autres espèces du genre *Vanilla*. Puisque d'une part des variations dans la taille du génome et dans le nombre de chromosomes ont été révélées au niveau intraspécifique pour *V. planifolia*, et que d'autre part une différence de comportement au niveau de la polyploïdie a été mise en évidence entre *V. planifolia* et *V. pompona*, il nous a paru intéressant d'étendre cette étude cytogénétique à d'autres espèces du genre. Comme pour *V. planifolia* et *V. pompona*, nous avons également examiné les relations entre la quantité d'ADN nucléaire et le nombre de chromosomes en relation avec le niveau de ploïdie. Cette étude reste bien entendu exploratoire car les chromosomes n'ont pas été comptés pour toutes les espèces et des mesures de la longueur des stomates devront être réalisées puisqu'ils sont des indicateurs satisfaisants du niveau de ploïdie (Przywara *et al.*, 1988; Masterson, 1994; Beck *et al.*, 2003; Seidler-Lozykowska, 2003; Bory *et al.*, submitted-a).

Quelques espèces seulement du genre *Vanilla* ont fait l'objet d'études cytogénétiques. La quantité d'ADN nucléaire a été évaluée pour *V. planifolia* (Kausch et Horner, 1984; Arumuganathan et Earle, 1991b; Zonneveld *et al.*, 2005), *V. pompona* et *V. phaeantha* (Jones *et al.*, 1998). En plus des études réalisées sur *V. planifolia* et *V. pompona*, les nombres chromosomiques ont été obtenus pour *V. barbellata*, *V. dilloniana* et *V. phaeantha* (Martin, 1963), *V. aromatica*, *V. hartii*, *V. imperialis* et *V. moonii* (Heim, 1954), *V. siamensis* (Larsen, 1966) indiquant 2n = 32. D'autres espèces étudiées possèdent un nombre chromosomique différent : 2n = 36 pour *V. roscheri* (Kurpko *et al.*, 1954), 2n = 24 pour *V. walkeriae* (Agrawal *et al.*, 1992), 2n = 64 pour *V. wightiana* (Soto Arenas, 2003) et pour *V. tahitensis* (Tonier, 1951) ou variant de 22 à 58 pour cette dernière (Duval *et al.*, 2006).

Tableau 3.1 : Code, nom d'espèce, origine phylogéographique selon les résultats du mVplCIR031 (Chapitre 2), provenance des accessions de *Vanilla* étudiées ainsi que les résultats des analyses.

				Cytométrie en flux		Comptages chromosomiques	
Code	**Espèce**	**Origine phylogéographique (selon résultats mVplCIR031)** [1]	**Provenance**	**Moyenne 2C pg (± e.t.)**	**Nombre de répétitions**	**Nombre médian**	**Nombre de cellules**
AF0103	*africana*	Afrique	Afrique	10.25 (± 0.06)	3		
AF0107	*africana*	Afrique	Afrique	10.22 (± 0.18)	3		
AL0058	*albida*	Asie	France (Paris)	5.90 (± 0.16)	2		
AL0793	*albida*	Asie	Thaïlande	5.15	1		
AP0145	*aphylla*	Asie	Thaïlande	9.81 (± 0.03)	2		
BA0062	*bahiana*	Amérique	France (Paris)	6.70 (± 0.32)	3		
BA0072	*bahiana*	Amérique	Brésil (Bahia)	6.60	1	26	88
BA0076	*bahiana*	Amérique	Brésil (Bahia)	6.52	1		
BA0085	*bahiana*	Amérique	Brésil (Bahia)	7.28	1		
BA0097	*bahiana*	Amérique	Brésil (Bahia)	7.09	1		
BA0099	*bahiana*	Amérique	Brésil (Bahia)	6.91	1		
CH0666	*chamissonis*	Amérique	Brésil (Sao Paulo)	8.22 (± 0.06)	2	18	12
CH0667	*chamissonis*	Amérique	Brésil (Sao Paulo)	8.14 (± 0.35)	3		
CH0702	*chamissonis*	Amérique	Royaume-Uni (Kew)	7.47 (± 0.03)	2		
CRE0067	*crenulata ?*	Afrique	Centrafrique	22.31	1		
CRE0696	*crenulata*	Afrique	France (Paris)	9.88 (± 0.34)	3	25	19
GR0693	*grandiflora (cf.)*	Amérique	Guyane	9.23 (± 0.25)	2		
HU0108	*humblotii*	Afrique	Grandes Comores	11.81 (± 0.09)	2		
HY0003	*hybride planifolia x tahitensis*	Amérique	Madagascar (Antalaha)	10.12 (± 0.10)	3	44.5	14
HY0056	*hybride planifolia x phaeantha*	Amérique	Guadeloupe (Petit Bourg)	4.48 (± 0.10)	3		
HY0747	*hybride planifolia x planifolia*	Amérique	Réunion/Madagascar	5.24 (± 0.12)	2		
IM0104	*imperialis*	Afrique	Afrique	6.93	1	20	34
IM0105	*imperialis*	Afrique	Afrique	10.14 (± 0.34)	2	29	31
IM0796	*imperialis*	Afrique	Danemark (Copenhague)	7.18 (± 0.0008)	2		
IM0797	*imperialis*	Afrique	Danemark (Copenhague)	7.06 (± 0.24)	2		
LE0109	*leprieuri*	Amérique	Guyane française	7.74 (± 0.02)	2	62	23
MA0141	*madagascariensis*	Afrique	Madagascar (Vohemar)	8.06	1	30	19
MA0142	*madagascariensis*	Afrique	Madagascar (Vohemar)	8.02	1		
OD0686	*odorata*	Amérique	France (Paris)	4.95 (± 0.12)	2		
PA0083	*palmarum*	Amérique	Brésil (Bahia)	7.00 (± 0.29)	3	22	27
PA0093	*palmarum*	Amérique	Guyane française	7.98 (± 0.28)	4		
PH0146	*phalaenopsis*	Afrique	France (Lyon)	12.00 (± 0.11)	2	17	84
SP0060	*sp.*	Amérique	France (Paris)	9.79 (± 0.21)	2	24	39
SP0068	*sp.*	douteuse	Costa Rica (Cahuita)	7.57 (± 0.21)	2		
SP0059	*sp (albida?)*	Asie	France (Paris)	8.65 (± 0.08)	2		
SP0069	*sp.*	Amérique	Brésil (Alagoinhas)	8.21 (± 0.07)	2		
SP0073	*sp.*	Amérique	Brésil (Bahia)	6.60	1		
SP0079	*sp.*	Amérique	Guadeloupe	8.15 (± 0.25)	3	27.5	18
SP0081	*sp.*	Amérique	France (Cherbourg)	10.81 (± 0.01)	2	24	47
SP0082	*sp.*	Afrique/Asie	France (Cherbourg)	10.30 (± 0.26)	3		
SP0087	*sp.*	Amérique	France (Cherbourg)	6.89 (± 0.05)	3	20	54
SP0091	*sp.*	Afrique	Afrique	10.24 (± 0.16)	2		
SP0102	*sp.*	Afrique	Afrique	9.79 (± 0.37)	3		
SP0106	*sp.*	Afrique	Afrique	10.47 (± 0.38)	2		

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Matériel végétal

Les 65 accessions analysées comprennent 15 espèces de *Vanilla*, trois hybrides (*V. planifolia* x *V. planifolia*, *V. planifolia* x *V. tahitensis*, *V. planifolia* x *V. phaeantha*) ainsi que des accessions non identifiées. Les échantillons ont été collectés à partir de lianes maintenues dans la collection de ressources génétiques du vanillier au CIRAD à La Réunion (Grisoni *et al.*, 2007). Cette collection contient des accessions obtenues grâce à des échanges avec des jardins botaniques, des collections privées ou collectées au cours de prospections. Les précisions pour chaque accession (espèce, provenance, analyses) sont présentées dans le Tableau 3.1. Les accessions pour lesquelles le nom d'espèce était disponible et/ou les accessions identifiées sur la base d'observations morphologiques fournies par les producteurs ou les botanistes, ont été codées AF pour *V. africana*, AL pour *V. albida*, AP pour *V. aphylla*, BA pour *V. bahiana*, CH pour *V. chamissonis*, CRE pour *V. crenulata*, GR pour *V. grandiflora*, HU pour *V. humblotii*, IM pour *V. imperialis*, LE pour *V. leprieuri*, MA pour *V. madagascariensis*, OD pour *V. odorata*, PA pour *V. palmarum*, PH pour *V. phalaenopsis*, TA pour *V. tahitensis* et HY pour les hybrides. Les accessions pour lesquelles l'identification était douteuse ou inconnue, soit quand les informations concernant l'espèce n'étaient pas disponibles, soit parce que la morphologie ne correspondait pas avec la description de l'espèce selon Portères (1954) ont été codées SP. Par ailleurs, l'origine phylogéographique des espèces étudiées déterminée sur la base des résultats obtenus avec le marqueur mVplCIR031 (cf. Chapitre 2) est indiquée dans le Tableau 3.1. Des feuilles entières ont été prélevées pour les analyses de cytométrie en flux et des extrémités de racines aériennes ont été récoltées pour les comptages chromosomiques.

II.2.2. Analyses cytogénétiques

La détermination de la quantité d'ADN nucléaire 2C par cytométrie en flux a été réalisée pour 65 accessions de *Vanilla*, avec une à quatre répétitions par accession, comme il a été précédemment décrit (Bory *et al.*, submitted-a), en

SP0110	*sp.*	Amérique	France (Cherbourg)	7.06 (± 0.31)	3	17	20
SP0112	*sp.*	Amérique	Guyane française	8.46 (± 0.42)	3	17	20
SP0113	*sp.*	Afrique	Liberia	6.44	1		
SP0114	*sp.*	douteuse	Paraguay	9.70 (± 0.01)	2		
SP0115	*sp.*	Amérique	France (Cherbourg)	9.74 (± 0.07)	3		
SP0116	*sp.*	Amérique	Guyane française	6.93 (± 0.06)	2		
SP0117	*sp.*	Amérique	Guyane française	7.02 (± 0.10)	2	17	59
SP0118	*sp.*	Amérique	Guyane française	8.61 (± 0.22)	3	21	92
SP0119	*sp.*	Amérique	Guyane française	6.59 (± 0.16)	3		
SP0120	*sp.*	Amérique	Guyane française	6.36 (± 0.11)	3		
SP0122	*sp.*	Amérique	Guyane française	6.38 (± 0.13)	3		
SP0139	*sp.*	Amérique	Madagascar (Vohemar)	9.77 (± 0.10)	2		
SP0153	*sp.*	douteuse	Guyane française	11.91 (± 0.11)	2		
SP0155	*sp.*	douteuse	Guyane française	11.80 (± 0.39)	3		
SP0166	*sp.*	Amérique	France (Montpellier) < Réunion	7.12 (± 0.34)	4		
SP0700	*sp.*	Amérique	Royaume-Uni (Kew)	7.22	1	18	24
SP0705	*sp.*	Amérique	Royaume-Uni (Kew)	10.45 (± 0.004)	2	20	23
SP0706	*sp.*	Amérique	Royaume-Uni (Kew)	6.86 (± 0.17)	2		
SP0707	*sp.*	Amérique	Royaume-Uni (Kew)	7.13 (± 0.08)	2	18.5	10
TAh0017	*tahitensis*	Amérique	Polynésie française (Raïatea)	4.72 (± 0.05)	2	21	42
TA0063	*tahitensis*	Amérique	France (Paris)	6.88 (± 0.13)	2		

[1] L'origine phylogéographique a été notée « douteuse » lorsque les accessions ont été récoltées dans des régions américaines mais qu'elles présentaient un profil Afrique/Asie au locus mVplCIR031.

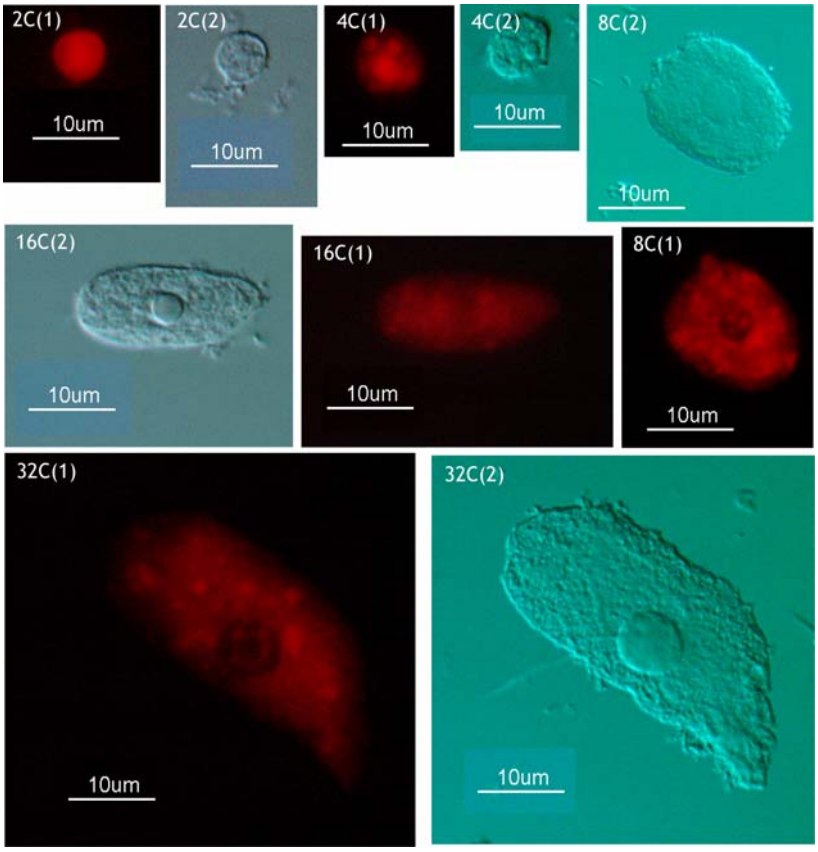


Figure 3.2 : Photographies de noyaux cellulaires de *V. planifolia* observés au microscope à épifluorescence Reichert Polyvar (1) pris en épifluorescence et (2) pris en mode contraste à interférence différentielle. Pour le mode en épifluorecence, l'excitation et l'émission se font respectivement dans les gammes de longueur d'onde 535-555 nm et 570-710 nm. Clichés : S. Brown.

utilisant le blé comme étalon de calibration interne, *Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring (2C = 30.9 pg; 43.7% GC).

Les comptages chromosomiques à partir de racines aériennes ont été réalisés pour 22 accessions, représentatives de la gamme de quantité d'ADN nucléaire observée en cytométrie de flux, selon le protocole de Arends et Van Der Laan (1986) avec de légères modifications, comme il a été précédemment décrit (Bory *et al.*, submitted-a).

II.2.3. Analyse des données

Les données ont été analysées avec le logiciel R pour Windows (version 2.5.1; (R Development Core Team, 2006), Vienne, Autriche).

II.3. Résultats

II.3.1. Cytométrie en flux

La taille de génome holoploïde i.e. la quantité d'ADN nucléaire 2C, définie par Greilhuber *et al.* (2005), a été obtenue pour 65 accessions d'espèces de *Vanilla*, avec deux à quatre répétitions pour la majorité des accessions (aucune répétition pour 13 accessions) (Tableau 3.1). Les histogrammes de fluorescence ont révélé cinq pics qui correspondent aux noyaux 2C, 4C, 8C, 16C et 32C et qui traduisent de l'endoréplication. La progression marginale (*Marginal Replication Ratio*), ou rapport entre les positions de deux pics consécutifs, est irrégulière de 1.5 à 1.8 (au lieu de 2) pour chaque histogramme. Comme pour *V. planifolia* et *V. pompona*, les pics 2C étaient souvent noyés dans un bruit de fond de débris nucléaires mais leur existence a pu être confirmée en les triant sur lame pour une observation microscopique (Figure 3.2, chez *V. planifolia*).

Les quantités d'ADN nucléaire 2C s'échelonnent de 4.48 pg (± 0.10) à 12.00 pg (± 0.11) pour 64 accessions, et une accession *V. crenulata* CRE0067 a une valeur extrême à 22.31 pg (Figure 3.3). Les coefficients de variation intra-accession n'excédent pas 5%.

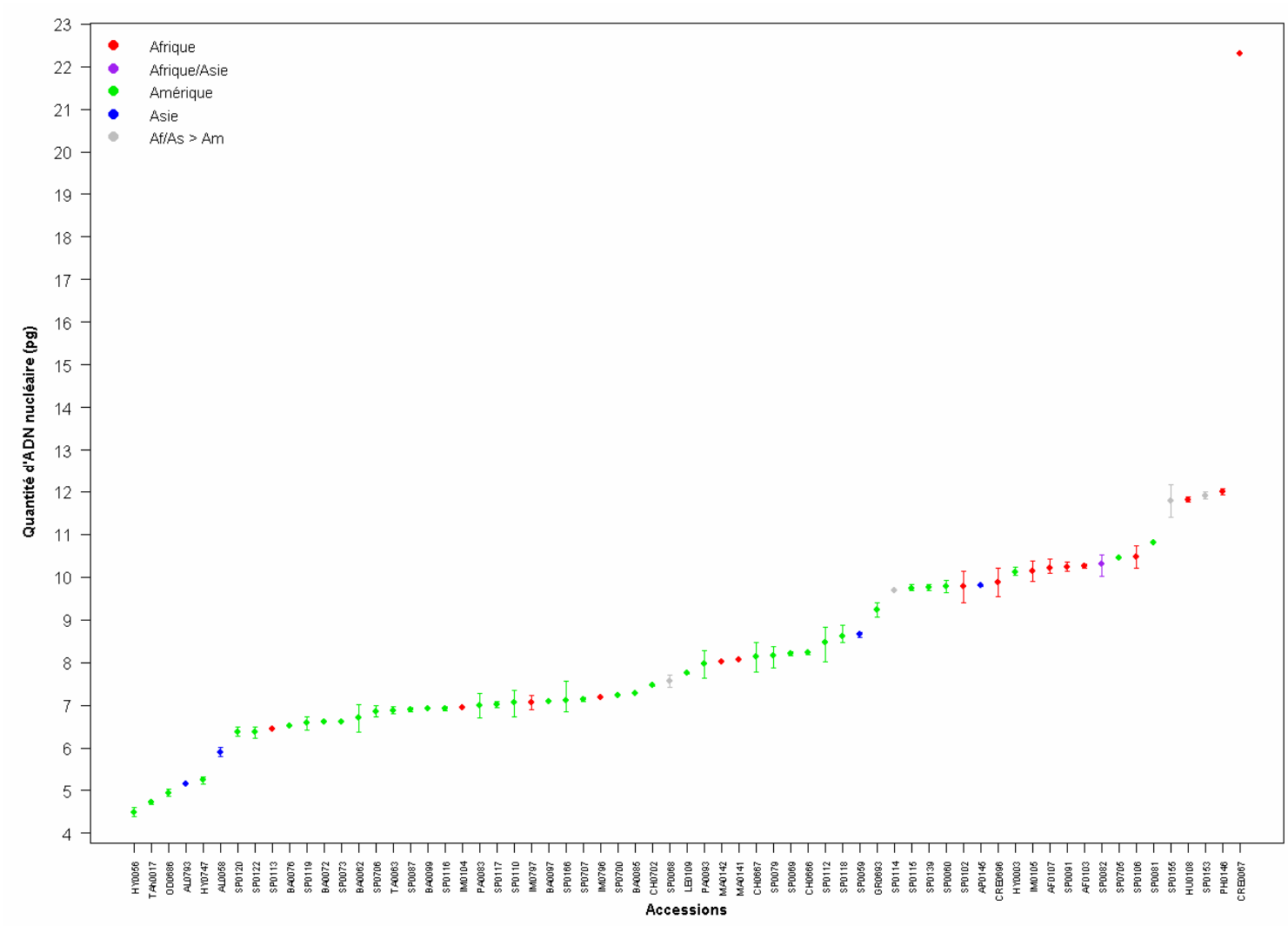


Figure 3.3 : Quantité d'ADN nucléaire 2C pour 65 accessions de *Vanilla*, estimée par la cytométrie en flux. Les points représentent les moyennes et les barres représentent les données minimales et maximales. La couleur renvoie à l'origine géographique présumée des accessions.

II.3.2. Détermination du nombre chromosomique

Le nombre chromosomique a été évalué pour 22 accessions de *Vanilla* d'espèces différentes et représentatives de la gamme de quantité d'ADN nucléaire observée en cytométrie de flux (exceptée la CRE0067 dont le plant n'a pas survécu). Une forte variabilité interspécifique est révélée puisque de 12 à 70 chromosomes ont été comptés par cellule. Par ailleurs, à l'instar de *V. planifolia* et *V. pompona*, une forte variation intra-individuelle dans le nombre chromosomique a été observée (par exemple de 13 à 32 pour l'accession SP0118 ou de 25 à 41 pour l'accession IM0105 de l'espèce *V. imperialis*) (Tableau 3.1, Figure 3.4). Le nombre médian de chromosomes par accession s'échelonne entre 17 et 30 pour 20 accessions. Deux accessions sont remarquables pour leur nombre élevé de chromosomes : l'accession LE0109 de l'espèce *V. leprieuri* possède le plus grand nombre médian de chromosomes (62) avec une amplitude intra-individuelle de 40 à 70 chromosomes. L'hybride HY0003 possède un nombre de chromosomes intermédiaire (44.5) avec une répartition intra-individuelle de 34 à 50 chromosomes (Tableau 3.1, Figure 3.4).

II.3.3. Relation entre nombre chromosomique et quantité d'ADN nucléaire

Les données obtenues pour *V. planifolia* et *V. pompona* analysées précédemment ainsi que les données de *V. tahitensis* publiées par Duval *et al.* (2006) ont été incluses dans cette analyse pour comparer leur distribution avec celle des autres espèces. La distribution de la quantité d'ADN nucléaire des espèces de *Vanilla* en fonction de leur nombre chomosomique est très hétérogène et ne permet pas d'établir de relation évidente (Figure 3.5). Pour une même quantité d'ADN nucléaire, les nombres chromosomiques sont très variables. L'accession CH0666 de l'espèce *V. chamissonis* à 8.22 pg possède 18 chromosomes alors que l'accession LE0109 de l'espèce *V. leprieuri* à 7.74 pg en possède 62 (Figure 3.6). De même pour les plus grandes quantités d'ADN nucléaire, l'accession SP0081 à 10.81 pg présente 24 chromosomes alors que l'accession hybride HY0003 *planifolia* x *tahitensis* à 10.12 pg en présente 44.5 (Figure 3.6).

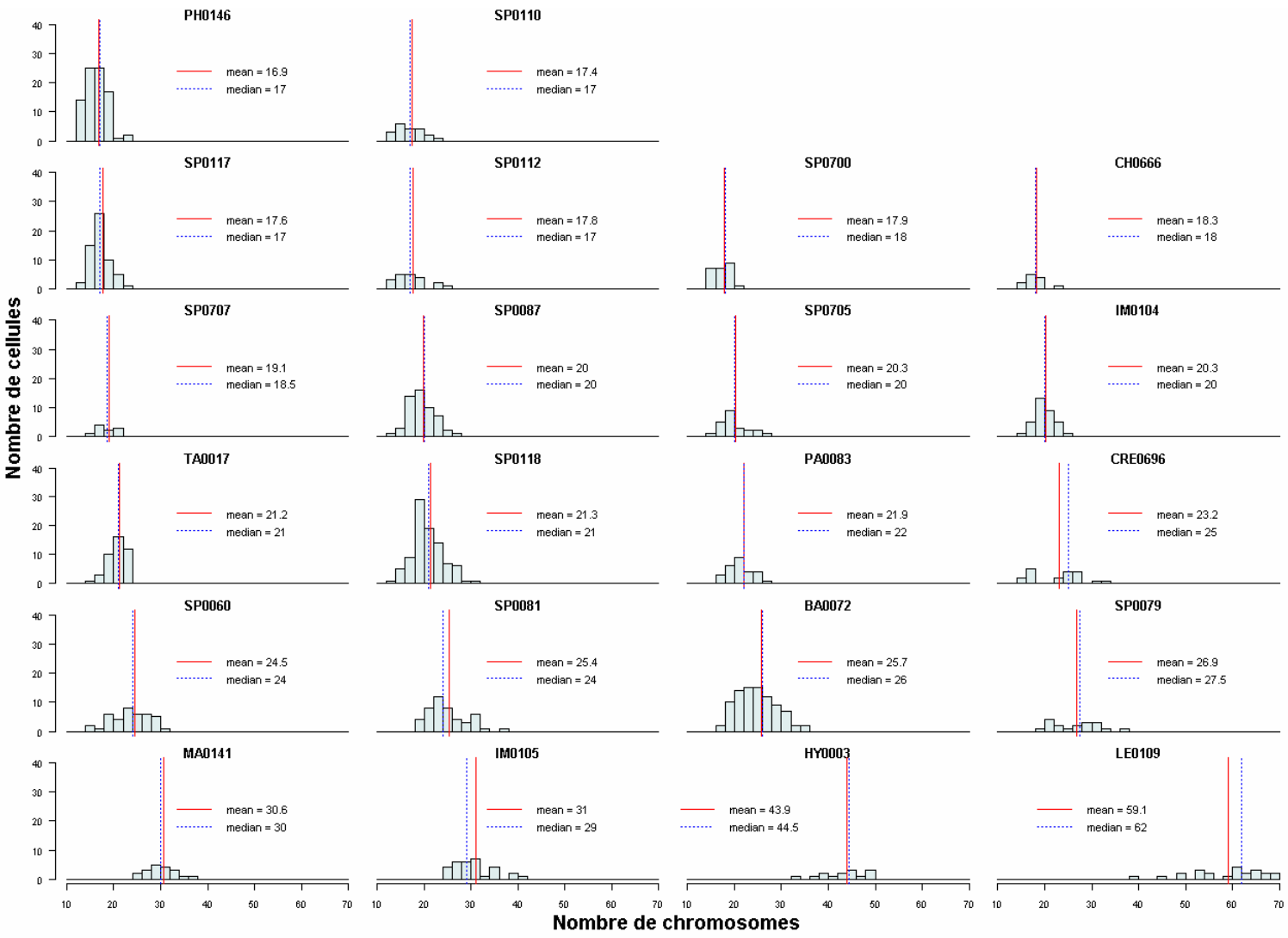


Figure 3.4 : Fréquences des nombres chromosomiques obtenus pour 22 accessions de *Vanilla*. Le nombre chromosomique moyen est représenté par un trait plein et la médiane par un trait pointillé.

De façon intéressante, l'espèce cultivée *V. tahitensis* pour laquelle plusieurs répétitions ont été analysées, se comporte comme *V. planifolia* (corrélation positive entre le nombre chromosomique moyen et la taille du génome).

II.4. Discussion

II.4.1. Aneuploidïe somatique et nombre chromosomique dans le genre **Vanilla**

Les comptages chromosomiques réalisés sur les racines aériennes ont mis en évidence des variations importantes tant au niveau intra que interspécifique (Figure 3.4). Cette variation intra-individuelle indique une forte aneuploïdie dans les cellules somatiques étudiées, comme il a été précédemment observé chez *V. planifolia* et *V. pompona*. Les 22 accessions analysées possèdent entre 2n = 17 et 2n = 62 chromosomes. La seule autre espèce de *Vanilla* de notre analyse ayant été étudiée auparavant est *V. imperialis*, décrite par Heim (1954) comme étant diploïde à 2n = 32. Deux accessions de *V. imperialis* ont été étudiées ici, IM0104 et IM0105 avec respectivement des valeurs médianes de 20 et 29 chromosomes. La référence indiquant simplement 2n = 32 est donc remise en question pour cette espèce, et tout comme *V. planifolia*, l'évaluation du nombre chromosomique de base au niveau haploïde, sur du pollen, sera indispensable.

II.4.2. Quantité d'ADN nucléaire dans le genre **Vanilla**

Les 65 accessions de *Vanilla* étudiées ont une quantité d'ADN nucléaire s'échelonnant de 4.48 pg pour l'hybride HY0056 à 22.31 pg pour *V. crenulata* CRE0067. Même si cette valeur peut paraître aberrante (une seule mesure de cytométrie avec le blé pour étalon interne), elle a été confirmée par une mesure avec un autre étalon (le pois). De plus, cette accession Foliosae récoltée en Centrafrique a montré sa particularité au cours d'une étude phylogénétique préliminaire avec le séquençage de quatre gènes chloroplastiques (Annexe 6 ; (Bouetard, 2007)). Elle pourrait être un ancêtre de certaines accessions africaines.

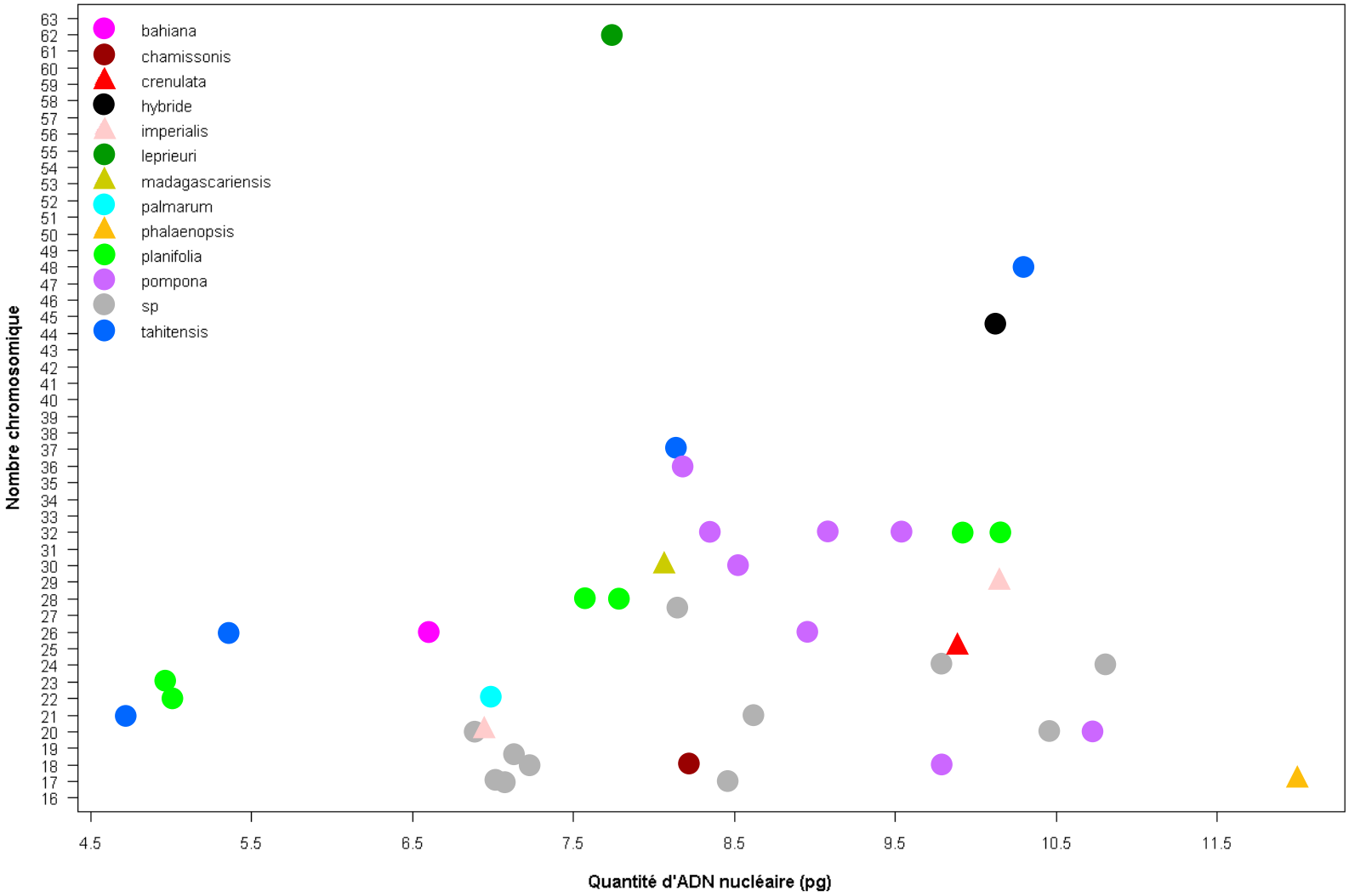


Figure 3.5 : Relation entre les nombres chromosomiques médians et la quantité d'ADN nucléaire moyenne pour 36 accessions de *Vanilla*. Toutes les accessions de la même espèce sont représentées par une même couleur, l'origine américaine est représentée par un rond et l'origine africaine par un triangle.

La relation entre la quantité d'ADN nucléaire des accessions et leur origine (selon leur profil au locus mVplCIR031) semble montrer que les accessions d'origine africaine ont en général une plus grande quantité d'ADN que les américaines (Figure 3.3). Les accessions américaines ont des quantités d'ADN nucléaire entre 4.48 pg pour HY0056 et 10.12 pg pour HY0003. Les accessions SP0705 (10.45 pg) et SP0081 (10.81 pg) doivent être considérées avec précaution. En effet, la SP0705 présentant un profil microsatellite américain a été montrée comme parente de *V. imperialis*, espèce africaine, par le séquençage de gènes chloroplastiques (Annexe 6 ; (Bouetard, 2007)). De même, la SP0081 est une aphylle américaine, mais démontrée comme maternellement phylogénétiquement proche des espèces africaines (Annexe 6 ; (Bouetard, 2007)). Les quantités d'ADN nucléaire chez les accessions africaines s'échelonnent de 6.44 pg pour l'accession SP113 à 22,31 pg pour CRE0067, avec cependant la majorité des accessions à partir de 9.79 pg. Les espèces américaines ont donc une petite quantité d'ADN nucléaire avec quelques cas de polyploïdie comme *V. pompona*, *V. planifolia* tétraploïdes, *V. tahitensis* tétraploïdes. Cameron (1999; 2000; 2003) suppose que la migration des espèces s'est réalisée avant la cassure du Gondwana (160 millions d'années) depuis l'Amérique via l'Afrique jusqu'en Asie. Les espèces africaines représentent donc une lignée majeure au sein du genre *Vanilla* pour résoudre l'évolution du genre et leur grande quantité d'ADN nucléaire suggère qu'elles pourraient avoir un ancêtre polyploïde.

II.4.3 Polyploïdie dans le genre **Vanilla**

La distribution de la quantité d'ADN nucléaire des espèces de *Vanilla* en fonction de leur nombre chomosomique est très hétérogène et ne permet pas d'établir de relation évidente, tant au niveau spécifique, qu'au niveau de l'origine phylogéographique des accessions (Figure 3.5). On retrouve la relation linéaire positive observée chez *V. planifolia*, ainsi qu'un comportement identique chez les *V. tahitensis* étudiés en Polynésie française (Duval *et al.*, 2006) avec trois niveaux de ploïdie : diploïde, triploïde (hybride artificiel) et tétraploïde. L'accession que nous avons étudiée TA0017 apparaît alors comme diploïde. On retrouve également la corrélation négative pour les accessions de *V. pompona* qui diffère en cela de *V.*

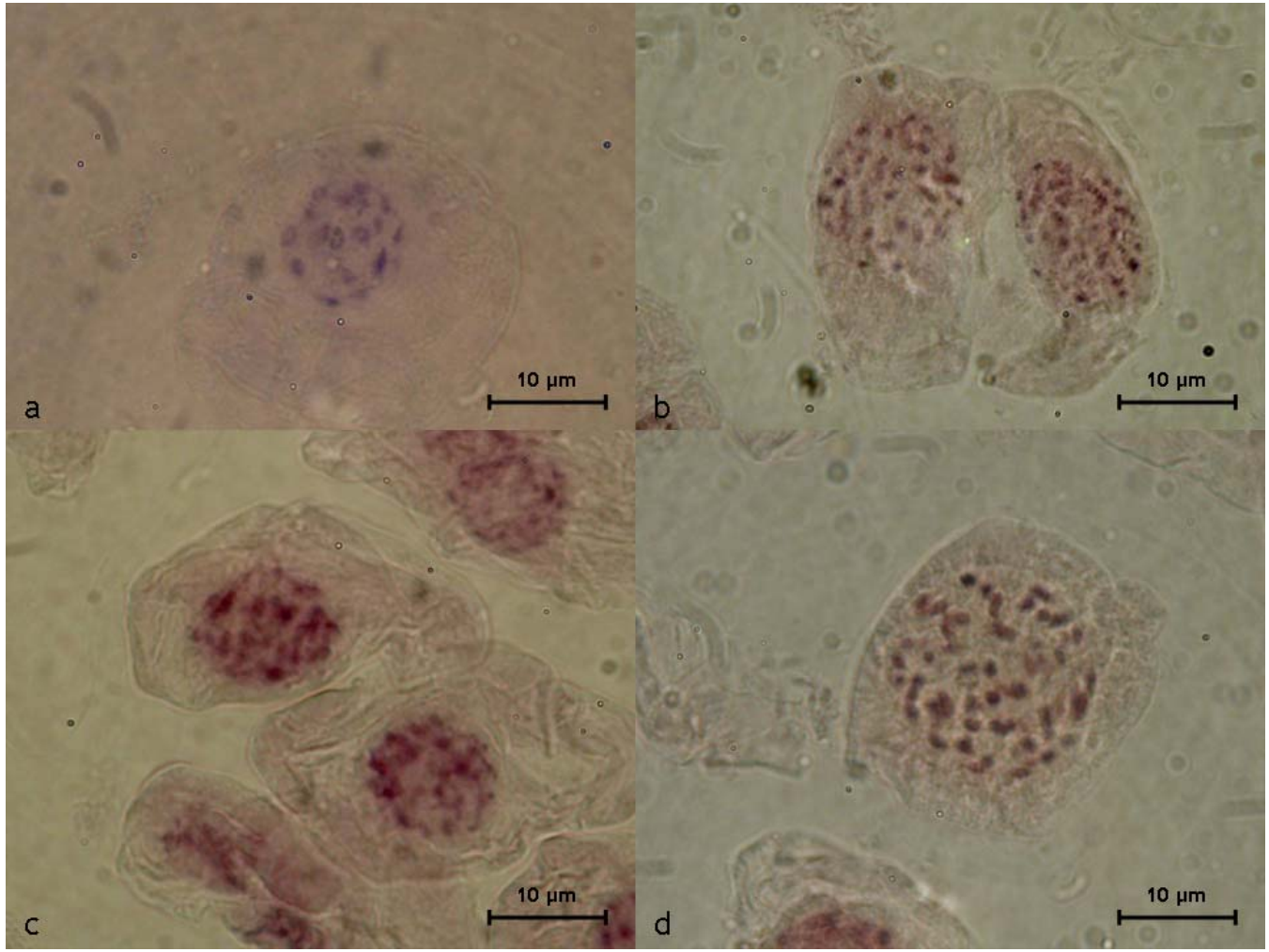


Figure 3.6 : Photographies de différents nombres chromosomiques, pour des quantités d'ADN nucléaire comparables, de cellules de racines aériennes de vanille colorées à l'acéto-orcéine. (a) CH0666 à 18 chromosomes (8.22 pg), (b) LE0109 à 50 et 62 chromosomes (7.74 pg), (c) SP0081 à 24 chromosomes (10.81 pg), (d) HY0003 à 45 chromosomes (10.12 pg). Clichés : R. Gigant.

planifolia. Le comportement d'un polyploïde peut varier en fonction de son histoire évolutive ce qui brouille la lisibilité des relations quantité d'ADN nucléaire/nombre chromosomique à l'échelle du genre. Il apparaît donc nécessaire, afin de comprendre les relations entre les variables mesurées, d'augmenter le nombre d'accessions pour chaque espèce afin de pouvoir comparer leur comportement face à la polyploïdie. Il sera aussi intéressant d'évaluer ces variations de quantité d'ADN nucléaire/nombre chromosomique en fonction de la phylogénie du genre *Vanilla* qui est en cours de construction (Bouetard, 2007).

Cette étude permet cependant de mettre l'accent sur certaines accessions remarquables comme *V. leprieuri* LE0109 qui se distingue des autres accessions par un nombre chromosomique impressionnant (62) mais une quantité d'ADN nucléaire moyenne (7.74 pg) ou comme *V. phalaenopsis* PH0146 qui se distingue au contraire par un petit nombre chromosomique (17) mais la plus grande quantité d'ADN nucléaire (12 pg) (Figure 3.5). Ces deux accessions ont donc des comportements différents du point de vue de leur ploïdie. L'accession LE0109 pourrait être un polyploïde ancien (probablement octoploïde) ayant subi des pertes génomiques (Leitch et Bennett, 2004). Sachant que sa quantité d'ADN nucléaire n'est pas aussi élevée que ne l'est son nombre chromosomique, ses chromosomes doivent être de plus petites tailles que ceux d'autres accessions aux tailles de génome similaires avec des nombres chromosomiques plus faibles. La Figure 3.6 (a et b) nous le montre pour l'accession CH0666 à 18 chromosomes et 8.22 pg. L'accession PH0146 pourrait être quant à elle un polyploïde ancien ayant subi des fusions chromosomiques (Leitch et Bennett, 2004). Il aurait été intéressant d'effectuer des comptages chromosomiques sur l'accession CRE0067 de l'espèce *V. crenulata* dont la quantité d'ADN nucléaire est très importante (22.31 pg). Mais comme elle était virosée, elle a dépérit entre le moment où les mesures de cytométrie et les comptages chromosomiques ont été réalisés.

Enfin, le cas de l'hybride HY0003 est intriguant. Cet hybride artificiel créé à Madagascar est issu d'un croisement entre le cv. 'Haapape' tétraploïde (Duval *et al.*, 2006) et *V. planifolia*. Il apparaît comme vraisemblablement tétraploïde au vu de sa taille de génome (10 pg) et de son nombre chromosomique médian (44,5 chromosomes), alors qu'une triploïdie était théoriquement attendue. Il résulte donc soit d'un croisement ayant utilisé un parent *V. planifolia* autotétraploïde, soit

d'une non réduction gamétique du parent *V. planifolia* diploïde. Le parent *V. planifolia* utilisé dans ce croisement n'étant pas disponible, il est difficile de conclure plus avant.

La polyploïdisation apparaît donc comme un élément de structuration fort de l'espèce et du genre. Il existe certainement des évènements de polyploïdisation récents ou anciens dans le genre *Vanilla* conduisant à des relations opposées entre nombre chromosomique et taille du génome, comme nous l'avons clairement démontré dans les articles précédents pour *V. planifolia* et *V. pompona*. Les comptages chromosomiques dans les voies gamétogènes seront à l'avenir indispensables pour s'affranchir des phénomènes d'aneuploïdie. Une étude préliminaire a donc été débutée sur quelques espèces du genre. La part respective de l'auto et de l'allopolyploïdisation chez les espèces mérite également d'être explorée compte tenu des phénomènes d'hybridation interspécifiques naturels suggérés par l'étude génétique précédente.

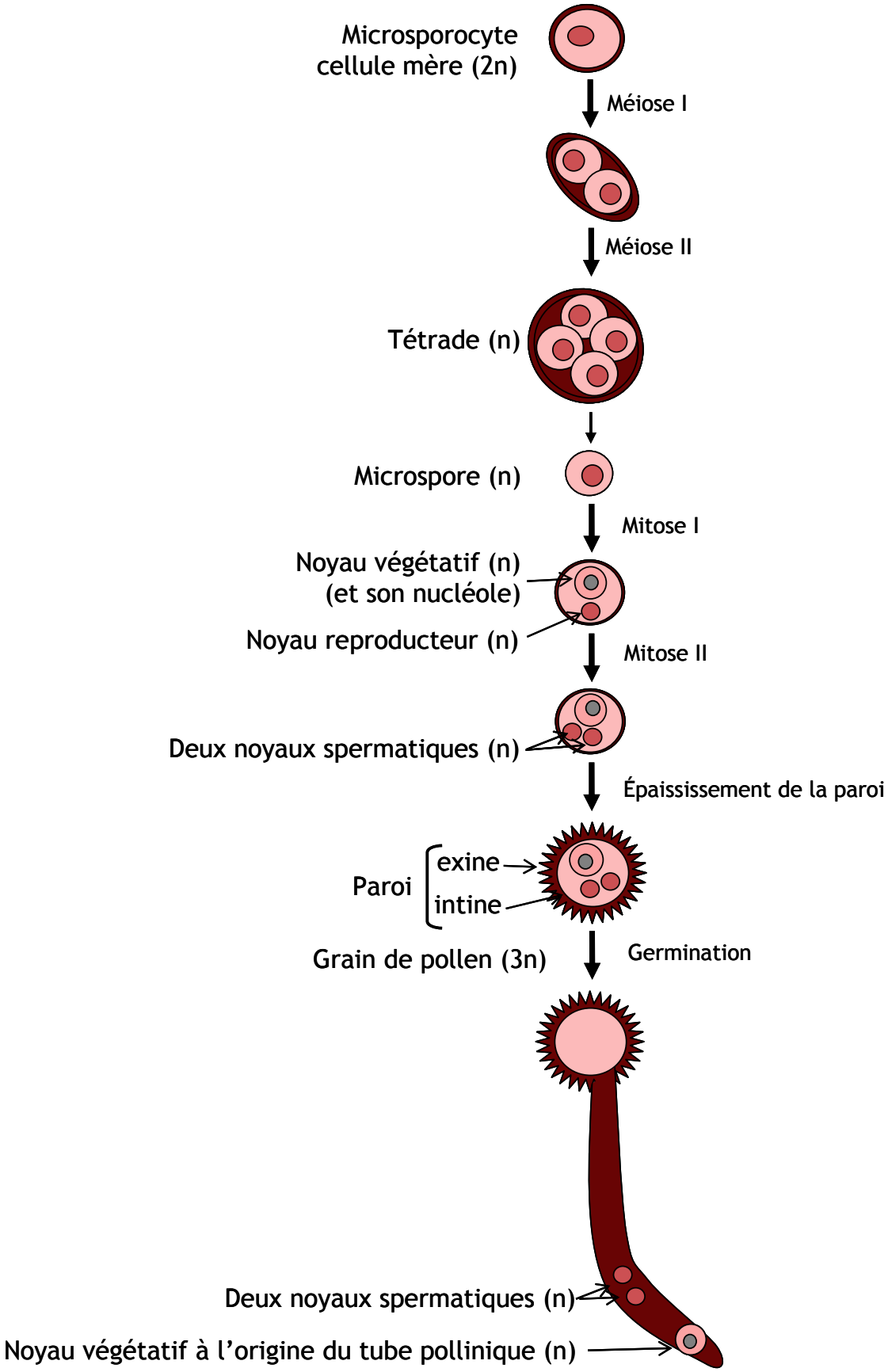


Figure 3.7 : Schéma de la formation d'un grain de pollen.

III. Résultats complémentaires préliminaires de l'analyse cytogénétique : comptages chromosomiques, viabilité et germination au niveau du pollen

III.1. Introduction

L'objectif de cette quatrième partie est de compléter les données de l'analyse cytogénétique. Cette étude est focalisée au niveau du pollen et deux aspects sont étudiés : en premier lieu, le nombre chromosomique de base est recherché dans le pollen de *V. planifolia*, *V. pompona*, *V. bahiana* et *V. tahitensis* et en deuxième lieu sont testées les conséquences sur la viabilité pollinique de la triploïdie d'un phénotype 'Stérile' de *V. planifolia* en comparaison avec le type 'Classique' diploïde afin d'expliquer son autostérilité.

III.1.1. Formation des grains de pollen

Nous avons vu dans les études précédentes qu'une forte aneuploïdie existait dans les cellules des racines aériennes, rendant délicate l'évaluation du nombre chromosomique de base. Il est alors essentiel de réaliser des comptages au niveau haploïde, sur du pollen en formation. Dans le sac pollinique ou microsporange, une cellule mère (microsporocyte) contenant un noyau 2n va se diviser au cours de la méiose en quatre cellules filles (microspores) à un seul noyau n (Figure 3.7). Chaque microspore évolue au cours d'une première mitose et contient alors deux cellules haploïdes : une cellule végétative volumineuse qui formera le tube pollinique et une petite cellule génératrice. La cellule reproductrice va se diviser au cours d'une deuxième mitose en deux cellules spermatiques. La paroi du microspore s'épaissit et il devient alors un grain de pollen. La cellule végétative va permettre la germination du tube pollinique et le noyau va ensuite dégénérer. Quant aux deux cellules spermatiques, l'un des noyaux va féconder l'oosphère pour donner un zygote 2n et l'autre va fusionner avec les deux globules polaires n de l'ovule pour former l'albumen 3n (Pesson et Louveaux, 1984; Lüttge *et al.*, 2002).

III.1.2. Mécanismes d'autostérilité

Pour expliquer l'autostérilité d'une plante, plusieurs mécanismes peuvent être invoqués : l'auto incompatibilité (gamétophytique et sporophytique), la stérilité mâle (génique, cytoplasmique et géno-cytoplasmique) et enfin la polyploïdie.

L'auto incompatibilité pollinique comprend deux systèmes (Brewbaker, 1957; Pesson et Louveaux, 1984). L'incompatibilité gamétophytique (GSI, Gametophytic Self-Incompatibility) est déterminée par la nature génétique haploïde du pollen (Kao et McCubbin, 1996) et concerne la plupart des espèces auto incompatibles (Brewbaker, 1957). Si le grain de pollen et le stigmate ont le même allèle du gène 'SI' en commun, la croissance du tube pollinique est inhibée par des RNases exprimées, codées par le gène 'SI' du stigmate (East et Mangelsdorf, 1926; Matton *et al.*, 1994; Kao et McCubbin, 1996). Mais si une autre plante n'a pas d'allèle commun avec le grain de pollen, la croissance du tube pollinique sera complète. L'incompatibilité sporophytique (SSI, Sporophytic Self-Incompatibility) est déterminée par la nature génétique diploïde de la plante dont est issu le pollen (Matton *et al.*, 1994; Kao et McCubbin, 1996). C'est au niveau de la paroi d'exine du grain de pollen que se déroulent les mécanismes d'incompatibilité sporophytique. Les protéines impliquées dans la reconnaissance sont un ligand présent dans l'exine et un récepteur, situé à la surface des cellules du stigmate (Matton *et al.*, 1994). Si le stigmate sur lequel se pose le pollen possède un allèle commun avec la plante dont est issu le grain de pollen, il ne germera pas (même si le grain de pollen ne porte pas cet allèle) (East et Mangelsdorf, 1926).

La stérilité mâle ou androstérilité est un système génétique conduisant à un avortement des fleurs mâles. Elle peut être génique, cytoplasmique ou géno-cytoplasmique. L'androstérilité génique (NMS, Nuclear Male Sterility) est gouvernée par un gène de stérilité 'ms' récessif (Athwal *et al.*, 1967; De Block *et al.*, 1997; Klindworth *et al.*, 2002). L'androstérilité cytoplasmique (CMS, Cytoplasmic Male Sterility) est gouvernée par un gène mitochondrial 'S', qui provoque l'absence de pollen fonctionnel (Duroc, 2004). Ce mécanisme est souvent utilisé par les

sélectionneurs pour obtenir des semences hybrides par exemple chez le maïs (Rhoades, 1930), le blé (Kihara, 1967) et le tournesol (Leclercq, 1969). L'androstérilité géno-cytoplasmique est une combinaison de deux facteurs, un gène de stérilité (*Cms*) dans le cytoplasme et un gène de restauration de la fertilité (R) dans le noyau (Rutger et Jensen, 1967; Hermsen, 1968; Burnham *et al.*, 1981; Vidakovic *et al.*, 2002).

Enfin, un dernier phénomène pouvant expliquer l'autostérilité d'un individu est l'autopolyploïdie, surtout la triploïdie (Wilson, 1962; Johnson *et al.*, 2003; Chen et Ni, 2006), provoquée soit par une non réduction des gamètes à la méiose (Bretagnolle et Thompson, 1995; Dvorak, 2004; Tate *et al.*, 2005), soit par un croisement entre des individus diploïde et tétraploïde (De Wet, 1980; Dvorak, 2004). Dans tous les cas, de tels triploïdes sont alors très souvent incapables de produire des embryons viables du fait de méioses forcément irrégulières en raison du nombre impair de chromosomes homologues (Belling, 1921; Belling et Blakeslee, 1923; Sybenga, 1996). Dans le cas de *V. planifolia*, nous avons démontré que les phénotypes 'Stérile' étaient triploïdes. Ceci peut donc expliquer leur autostérilité. L'influence de cette triploïdie sur la viabilité pollinique peut être alors vérifiée.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Observation préliminaire des chromosomes dans le pollen

L'observation des chromosomes dans les cellules mères de grains de pollen a été réalisée au stade métaphase I de la méiose selon le protocole de Tanguy et Eber (1992) modifié. L'inflorescence entière est récoltée idéalement en début de matinée afin d'avoir des conditions de température fraîche et d'hygrométrie élevée. Les pollinies sont prélevées et fixées dans un mélange fraîchement préparé de 3:1 éthanol : acide acétique pendant 48 h - 72 h à température ambiante. Les pollinies sont dé-solidarisées et le pollen éparpillé dans une goutte de carmin acétique à 1%. Les observations des cellules mères de grains de pollen se font au microscope Letz DM RBE (Leica, Wetzlar, Allemagne) au grossissement x 1000. Les observations ont été réalisées chez des *V. planifolia* en plantation (types

'Classique' et 'Stérile'), *V. pompona* PO0047, *V. bahiana* BA0062 et *V. tahitensis* TA0017.

III.2.2. Viabilité des grains de pollen

La viabilité des grains de pollen a été déterminée *in vitro* par coloration au bleu d'aniline à 1/1000e dans du lactophénol. La viabilité a été évaluée en dénombrant les grains de pollen anormaux chez *V. planifolia* sur deux fleurs d'un phénotype 'Stérile' PLst0630 et comparée à celle d'une accession du phénotype 'Classique' en plantation. Cinq comptages ont été réalisés par accession à raison de 100 grains de pollen par comptage. Les grains sont considérés normaux si la totalité du grain est colorée en bleue, sans déformation et anormaux si le cytoplasme est vide ou caractérisé par la présence de quelques petits organites non colorés. Les observations ont été réalisées au microscope Leica DM 2500.

III.2.3. Evaluation du pouvoir germinatif

Le pouvoir germinatif a été évalué *in vitro*. Les pollinies d'une fleur fraîchement ouverte ont été placées dans une solution de saccharose à 10% pendant 30 h pour faire germer le pollen puis fixées dans une solution de formaldéhyde:acide acétique glacial:éthanol (FAA, 1:1:8) (Borda *et al.*, 1999). Le taux de germination a été évalué en dénombrant les grains de pollen germés par paquet de grains de pollen (les grains étant agglutinés) chez une accession 'Stérile' PLst0630 et une accession 'Classique' de *V. planifolia* en plantation. Un grain est considéré germé s'il présente un tube pollinique. Les observations ont été réalisées au microscope Leica DM 2500.

III.2.4. Analyse des données

Les données de viabilité et de germination ont été analysées avec le logiciel R pour Windows (version 2.5.1; (R Development Core Team, 2006), Vienne, Autriche). Un test de Chi^2 de Pearson a été réalisé sur ces mesures afin de déterminer si les proportions de grains germés et viables sont différentes entre les

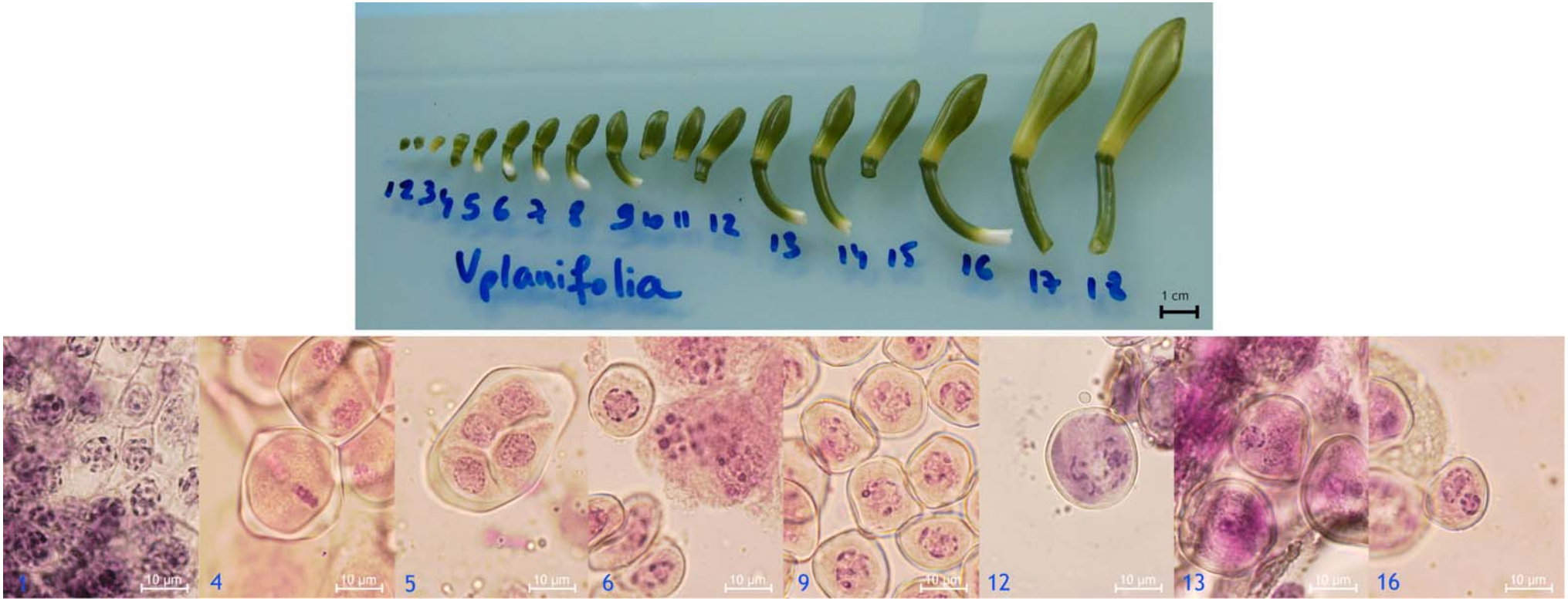


Figure 3.8 : Photographies des différents stades évolutifs des bourgeons des inflorescences de *V. planifolia* 'Classique' et des phases cellulaires correspondantes de la formation d'un grain de pollen après coloration au carmin acétique : (1) cellules du sac pollinique en interphase, (4) microsporocytes en métaphase de la méiose 1 (n = 16), (5) tétrade, (6) et (9) microspores à un noyau, (12) microspore en division de mitose 1, (13) et (16) microspores à deux noyaux, végétatif (peu coloré avec un nucléole volumineux) et reproducteur (coloré et condensé).

accessions 'Stérile' et 'Classique'. La *p*-value est calculée par simulation selon un test de Monte Carlo avec 2000 répliquats (Hope, 1968).

III.3. Résultats

III.3.1. Observation préliminaire des chromosomes sur pollen

Les observations ont été réalisées chez *V. planifolia* (types 'Classique' et 'Stérile' en plantation), *V. pompona* PO0047, *V. bahiana* BA0062 et *V. tahitensis* TA0017. Afin de compter les chromosomes dans les cellules mères de grains de pollen (microsporocytes), il a été nécessaire de déterminer le meilleur stade des boutons floraux étudiés en suivant l'évolution de la formation du grain de pollen.

Le développement du grain de pollen est expliqué à partir des stades de l'inflorescence de *V. planifolia* 'Classique' (Figure 3.8) et récapitulé dans le Tableau 3.2. Les stades 1 à 3 montrent des cellules de la paroi du sac pollinique, en interphase, caractérisées par des gros amas d'hétérochromatine. Le stade 4 présente des sporocytes en division de méiose, qui donneront quatre cellules filles ou microspores, observées au stade 5. Les stades 6 à 11 montrent des microspores en interphase, de plus en plus nombreux. Au stade 12, les microspores rentrent en division de mitose, une seule cellule a pu être observée en métaphase, où les chromosomes peuvent potentiellement être comptés. Les microspores possèdent alors deux noyaux (stades 13 à 18), le gros noyau végétatif avec un nucléole bien apparent et le noyau reproducteur plus petit. La deuxième mitose n'a pu être observée pour *V. planifolia*, ni de grain de pollen à maturité.

Pour les autres accessions étudiées *V. planifolia* 'Stérile', *V. pompona* PO0047, *V. bahiana* BA0062 et *V. tahitensis* TA0017, les stades floraux et stades polliniques ont pu être également corrélés (Tableau 3.2, Figure 3.9 à 3.12).

Le stade recherché pour compter le nombre de chromosomes haploïdes est la première division de méiose des cellules mère de grains de pollen, mais il est possible de les observer sur les stades qui suivent tels que la première mitose. Dans le cas de l'accession de *V. planifolia* 'Classique' étudiée, la première division de méiose s'est produite au stade 4 et la première division de mitose entre les stades 12 et 13 (Tableau 3.2, Figure 3.8).

Tableau 3.2 : Numéros des stades des bourgeons des inflorescences correspondant aux stades de la formation des grains de pollen (Figures 3.8 à 3.12).

Stade de formation du pollen	Stade des bourgeons de l'inflorescence				
	V. planifolia **'Classique'**	*V. planifolia* **'Stérile'**	*V. pompona* **PO0047**	*V. bahiana* **BA0062**	*V. tahitensis* **TA0017**
Cellules de la paroi du gamétophyte	1 - 3		1	1 - 4	1 - 3
Microsporocyte en division de méiose	4		2	5	4 - 5
Tétrade	5		2		6 - 7
Microspore à un noyau	6 - 12	1 - 4	3 - 7	6	8 - 11
Microspore à deux noyaux	13 - 18	5 - 7	8	7	

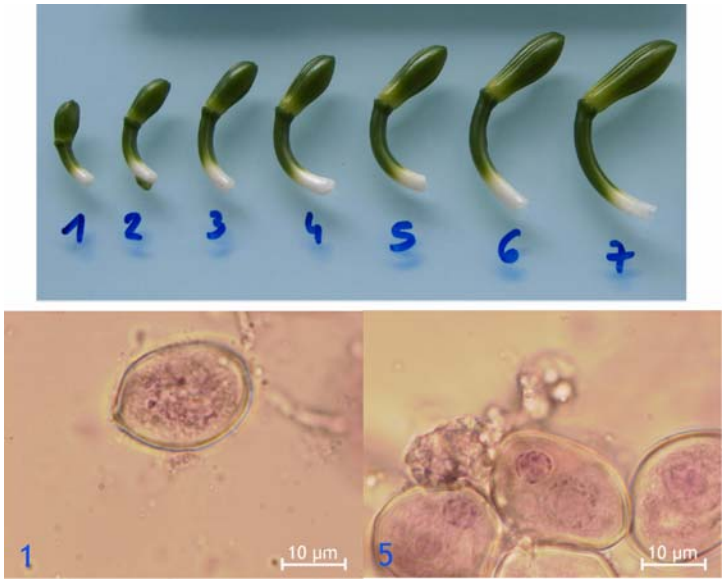


Figure 3.9 : Photographies des différents stades évolutifs des bourgeons d'une inflorescence de *V. planifolia* 'Stérile' et des phases cellulaires correspondantes de la formation d'un grain de pollen après coloration au carmin acétique : (1) microspore en interphase, (5) microspore à deux noyaux, végétatif (peu coloré avec un nucléole volumineux) et reproducteur (coloré et condensé).

Nos manipulations ont permis de dénombrer n = 16 chromosomes pour *V. planifolia* 'Classique' au stade de la première division de méiose d'un microsporocyte à partir d'une seule observation (stade 4, Figure 3.8 ; Figure 3.13 a). Pour *V. pompona* PO0047, deux observations ont permis de dénombrer n = 32 chromosomes à partir de microspores au stade de la première mitose (Figure 3.13, b et c).

III.3.2. Viabilité des grains de pollen

La méthode au bleu d'aniline colore les calloses et permet donc de repérer les grains de pollen totalement développés par rapport à ceux ayant avorté pendant le développement (Kelly *et al.*, 2002). La viabilité a été évaluée par cette méthode colorimétrique en dénombrant les grains de pollen anormaux chez deux accessions de *V. planifolia* 'Stérile' comparées à une accession de 'Classique'. Le diamètre moyen des grains de pollen pour la 'Classique' ou les 'Stérile' est constant à environ 10 µm (Figure 3.14). Sur 500 grains de pollen, 35, 44 et 5 grains étaient anormaux pour les deux fleurs du 'Stérile' et la fleur du 'Classique', respectivement. Le taux de viabilité des accessions étudiées est donc de 93% et 91.2% pour les 'Stérile' et de 99% pour la 'Classique'. Le test de Chi^2 montre que les proportions de grains de pollen anormaux chez les deux individus 'Stérile' sont différentes de celles de la 'Classique' ($P < 0.001$) et les proportions entre les deux 'Stérile' sont identiques ($P = 0.343$).

III.3.3. Evaluation du taux de germination

Après germination dans le saccharose, les grains de pollen étant agglutinés, le taux de germination a été évalué sur cinq paquets de grains, chez une accession de 'Stérile' et une accession de 'Classique' (Figure 3.13). Sur 149 et 157 grains de pollen totaux dénombrés respectivement pour la 'Stérile' et la 'Classique', 29 et 113 grains étaient germés. Le taux de germination est donc de 19.5% pour la 'Stérile' et 72% pour la 'Classique'. Le test de Chi^2 montre que la proportion de

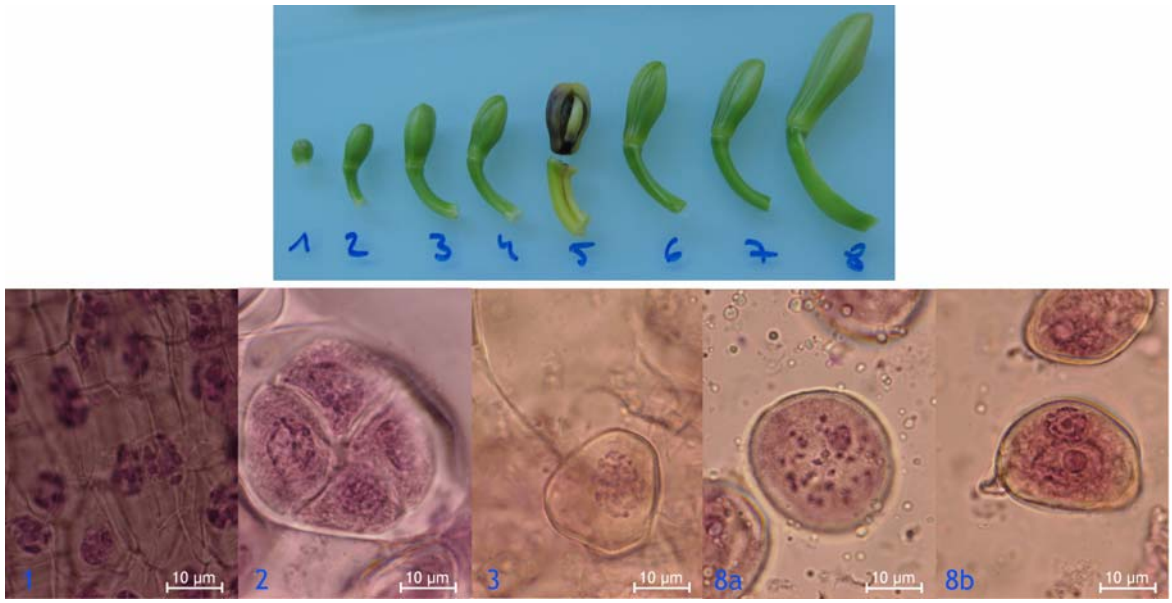


Figure 3.10 : Photographies des différents stades évolutifs des bourgeons d'une inflorescence de *V. pompona* PO0047 et des phases cellulaires correspondantes de la formation d'un grain de pollen après coloration au carmin acétique : (1) cellules du sac pollinique en interphase, (2) tétrade, (3) microspore à un noyau, (8a) microspore en métaphase de la division de mitose 1 (n = 32), (8b) microspore à deux noyaux, végétatif (peu coloré avec un nucléole volumineux) et reproducteur (coloré, et condensé).

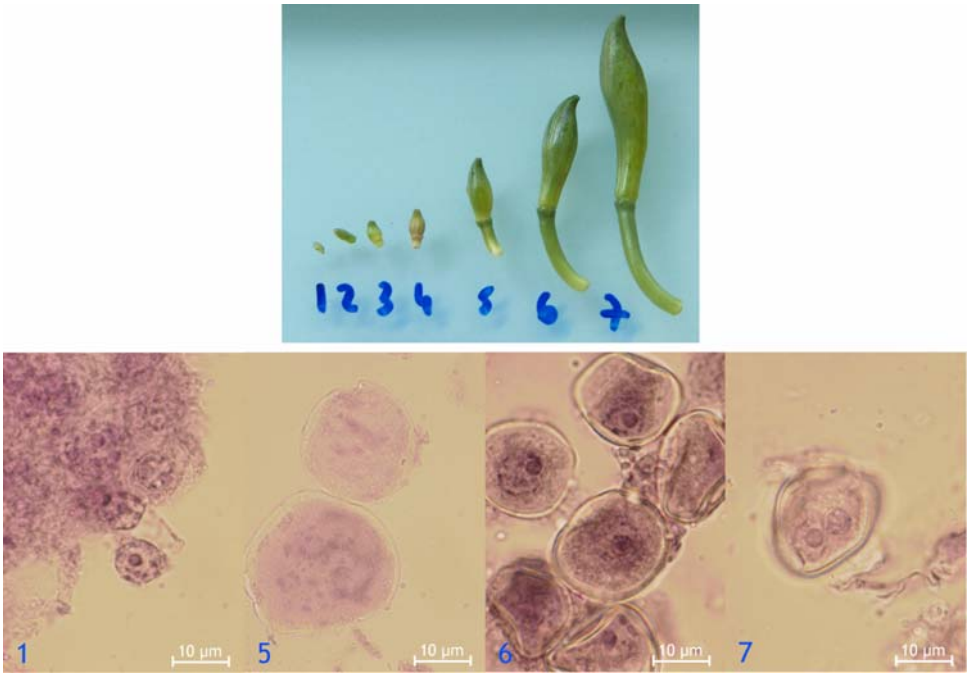


Figure 3.11 : Photographies des différents stades évolutifs des bourgeons d'une inflorescence de *V. bahiana* BA0062 et des phases cellulaires correspondantes de la formation d'un grain de pollen après coloration au carmin acétique : (1) cellules du sac pollinique en interphase, (5) microsporocytes en métaphase de la méiose 1, (6) microspores à un seul noyau, (7) microspore à deux noyaux, végétatif (peu coloré avec un nucléole volumineux) et reproducteur (coloré et condensé).

grains germés chez l'accession 'Stérile' est différente de celle de la 'Classique' ($P < 0.001$).

III.4. Discussion

III.4.1. Observation des chromosomes dans le pollen

L'évaluation des nombres chromosomiques sur cellules mères de grain de pollen est une tâche délicate. Ces résultats préliminaires ont toutefois permis une première évaluation de la correspondance chez *V. planifolia* entre les stades de développement des boutons floraux et les stades de formation des grains de pollen, ainsi que chez *V. pompona*, *V. bahiana* et *V. tahitensis*. Il est en effet indispensable de connaître le stade des boutons floraux qui montrera la première division de méiose des microsporocytes. Nous n'avons jamais observé la deuxième division de mitose du noyau reproducteur. Chez la plupart des angiospermes, ce noyau ne se divise en effet que juste après la germination du grain de pollen (Steffen, 1963). Toutefois, lors d'observations sur *V. planifolia*, Ravindran (1979) note que même 96 heures après germination, aucune division chromosomique ne peut être observée dans les tubes polliniques. Il est donc fort probable que chez le vanillier, la dernière division se produise à un stade encore plus tardif, probablement seulement quand le tube pollinique pénètre dans l'ovule, comme c'est le cas chez les Euphorbiacées (D'Amato, 1947) dans (Ravindran, 1979), voire que cette dernière division ne se produise pas, comme c'est le cas chez certaines orchidées comme *Spiranthes sinensis* (Terasaka *et al.*, 1979).

Ces manipulations ont aussi permis une première estimation n = 16 pour *V. planifolia* 'Classique' malheureusement à partir d'une seule observation et n = 32 pour *V. pompona* PO0047 à partir de deux observations. Dans les études précédentes, une forte aneuploïdie avait été rencontrée dans les cellules de racines aériennes aussi bien pour *V. planifolia* que pour *V. pompona*. Les *V. planifolia* du type 'Classique', appartenant au groupe diploïde 5.03 pg en cytométrie en flux, présentent un nombre chromosomique de 2n = 22 à 2n = 24 en désaccord avec certains auteurs indiquant simplement 2n = 32 (Hoffmann, 1929,

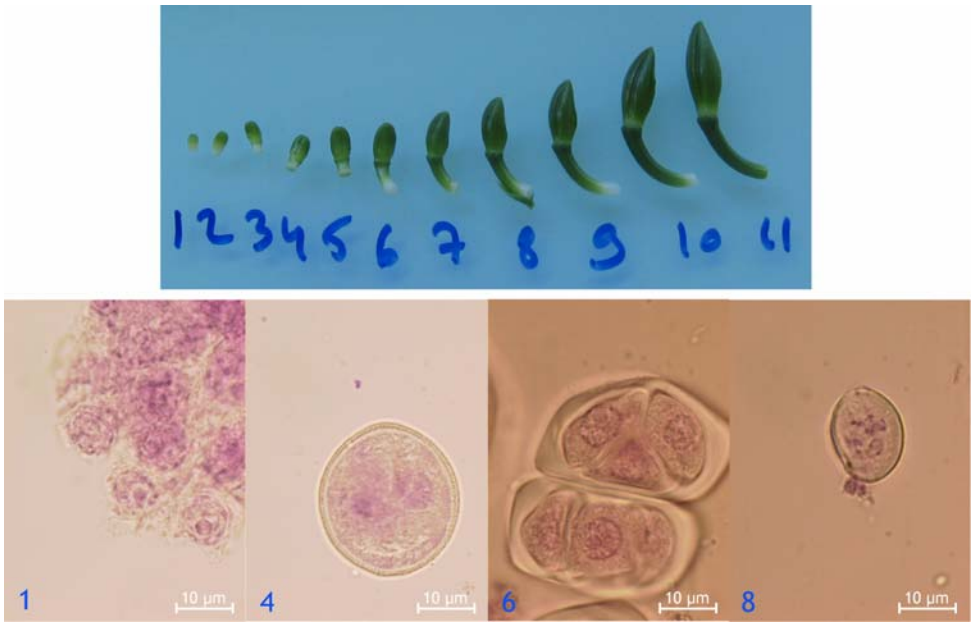


Figure 3.12 : Photographies des différents stades évolutifs des bourgeons d'une inflorescence de *V. tahitensis* TA0017 et des phases cellulaires correspondantes de la formation d'un grain de pollen après coloration au carmin acétique : (1) cellules du sac pollinique en interphase, (4) microsporocyte, (6) tétrades, (8) microspore à un noyau en métaphase de la mitose 1.

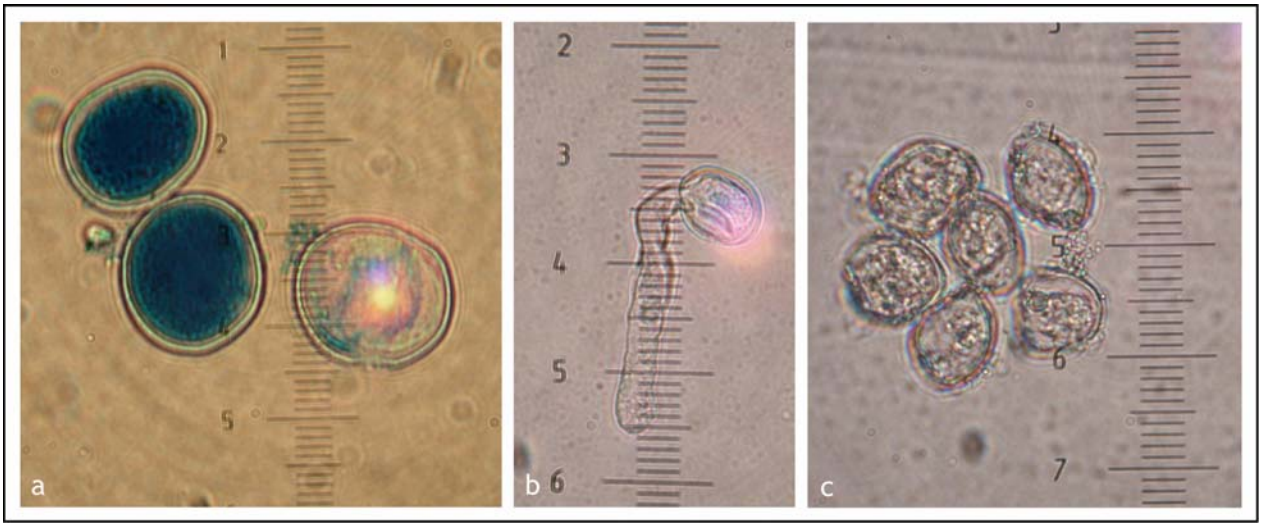


Figure 3.14 : Photographies de grains de pollen de *V. planifolia* : (a) viable (bleu) et non viable (blanc) chez une 'Classique' après coloration au bleu d'aniline (grossissement x630, une petite graduation = 0.63 µm), (b) germé chez une 'Classique' et (c) non germé chez une 'Stérile', après 30h de germination dans du saccharose à 10% (grossissement x400, une petite graduation = 1 µm). Clichés : L. Humeau.

1930; Heim, 1954; Chardard, 1963; Martin, 1963) et en accord avec d'autres auteurs montrant plutôt une forte variation du nombre chromosomique (Hurel-Py, 1938; Nair et Ravindran, 1994). L'accession PO0047 de *V. pompona* appartenant au groupe B (phénotypique, génétique, cytogénétique), est caractérisée par un nombre chromosomique de 2n = 26 à 2n = 36 et une taille de génome 2C de 9.45 pg, en désaccord avec les auteurs indiquant simplement 2n = 32 (Heim, 1954; Martin, 1963). Le comptage des chromosomes au niveau haploïde est devenu alors indispensable pour déterminer le nombre chromosomique de base et le niveau de ploïdie de ces espèces. Nos comptages chromosomiques préliminaires sur pollen montreraient donc que *V. planifolia* 'Classique' est diploïde avec un nombre chromosomique de base n = 16 confirmant les données de Heim (1954) et Chardard (1963) et *V. pompona* PO0047 tétraploïde avec n = 32.

Ces manipulations ont été initiées en fin de période de floraison 2006, et compte tenu du calendrier de cette thèse, n'ont pas pu être répétées car la floraison est à peine démarrée en octobre 2007. Ces travaux vont être poursuivis sur la période novembre 2007-janvier 2008.

III.4.2. Influence de la triploïdie sur la viabilité pollinique

Pour la *V. planifolia* 'Classique', la viabilité des grains de pollen est très bonne (99%). Le taux de germination *in vitro* n'est toutefois que de 72%. Dans une précédente étude, Ravindran (1979) donne un taux de germination encore plus faible pour *V. planifolia* avec seulement 45%. Parmi les pollens non germés, il note le plus souvent n = 14 chromosomes (et parfois 16) et observe de nombreuses fusions chromosomiques, ceci l'ayant conduit à supposer que *V. planifolia* aurait une origine hybride. Ces observations vont dans le même sens que celles effectuées au niveau des mitoses (Nair et Ravindran, 1994). Ainsi, même chez les *V. planifolia* diploïdes, il semble exister un certain pourcentage de stérilité pollinique.

La viabilité des grains de pollen des types triploïdes 'Stérile' est seulement légèrement plus faible (91.2 et 93%) que celle du type 'Classique'. Les triploïdes sont pourtant supposés être fortement infertiles du fait de la ségrégation irrégulière des chromosomes conduisant au développement de gamètes avortés

Figure 3.13 : Photographies (a) d'un microsporocyte de *V. planifolia* à n = 16 en métaphase de la méiose, (b) et (c) de microspores de *V. pompona* à n = 32 en métaphase de la première mitose.

(Sybenga, 1996; Olsen *et al.*, 2006b). Olsen *et al*. (2006a) suggèrent que les méthodologies de coloration des grains de pollen surestiment souvent la viabilité, et que les manipulations de germination (et de pollinisation) sont les seuls vrais indicateurs de la viabilité pollinique. Ainsi alors que chez des *Hypericum androsaemum* triploïdes, le taux de viabilité du pollen était de 40.6% (Olsen *et al.*, 2006b), les taux de fructification sont en réalité très faibles. De la même façon, chez des spécimens triploïdes du genre *Pomaderis*, jusqu'à 55% des pollens sont viables, mais parmi eux seulement 30% germent *in vitro* (Harvey et Rattenbury, 1985).

Ceci semble être aussi le cas dans notre étude. En effet, l'accession 'Stérile' testée germe beaucoup moins bien (19.5%) que la 'Classique' (72%), confirmant donc la très faible viabilité pollinique de l'accession triploïde. Les observations au champ montrent en général qu'une fleur de 'Stérile' autofécondée tombe au bout de quelques semaines. Dans des rares cas, nous avons aussi pu observer la production d'une gousse issue d'autofécondation qui s'est allongée pendant deux à trois mois avant de chuter. De plus, nous avons observé pour les accessions PLst0630 et PLst0645 la production de gousses issues d'allofécondation avec des individus 'Classique'. Ceci est en accord avec la suggestion de Bretagnolle (1995) qui indique que chez les triploïdes, les gamètes mâles sont généralement stériles, alors que les gamètes femelles montrent une certaine fertilité. Plus largement, la fertilité des triploïdes dépend de la production de gamètes euploïdes (n = x, 2x, ou 3x) mais aussi de la tolérance des gamètes ou du zygote vis-à-vis de l'aneuploïdie (Olsen *et al.*, 2006b). Chez *Hypericum androsaemum,* la fécondation de plantes femelles triploïdes par du pollen 2x, 3x ou 4x parvient à produire quelques fruits, mais le nombre de graines est réduit et aucune n'est viable (Olsen *et al.*, 2006b). A contrario chez les myrtilles (*Vaccinium corymbosum*) ou les bananiers triploïdes, une certaine fertilité peut être parfois observée associée à une production de gamètes euploïdes (de type 2n) (Vorsa et Ballington, 1991; Ortiz et Vuylsteke, 1995). Tel est aussi le cas chez les espèces du genre *Pomaderis* triploïdes (Harvey et Rattenbury, 1985).

Dans le cas des *V. planifolia* triploïdes, il est donc possible que les 19.5% de grains de pollens fertiles produits possèdent en fait un nombre euploïde de chromosomes.

Certains auteurs montrent que la taille des grains de pollen peut être utilisée pour détecter les gamètes euploïdes par rapport aux aneuploïdes (Harvey et Rattenbury, 1985; Kelly *et al.*, 2002). Une telle approche pourrait être testée dans le cas des vanilliers triploïdes. Par ailleurs, la fertilité observée des croisements des *V. planifolia* 3x par 2x implique qu'il existe peut-être une meilleure tolérance à l'aneuploïdie du gamète femelle, ou une plus forte proportion de gamètes femelles euploïdes produits.

Dans tous les cas, ces résultats préliminaires méritent d'être approfondis. Ces manipulations ont été rendues difficiles par la localisation des accessions stériles en plantation à St-Philippe et la difficulté de prédire les dates et jours de floraison. Elles seront facilitées dès que les accessions stériles en collection fleuriront. Il s'agira alors de mettre en place des manipulations d'auto et d'allofécondation et de réaliser des mesures précises de viabilité pollinique, germination *in vitro* et *in vivo*, taux de fructification et viabilité des embryons, sur des accessions diploïdes ('Classique'), triploïdes ('Stérile') mais aussi tétraploïdes ('Grosse Vanille'). Associées à des comptages du nombre chromosomique de base n dans les grains de pollen de ces accessions, il sera alors possible de préciser l'impact de la polyploïdie sur leur fertilité.

IV. Conclusions de l'analyse cytogénétique

Dans ce troisième chapitre, nous avons mis en évidence l'importance de la polyploïdisation dans l'évolution du genre *Vanilla*. Une forte variation de la quantité d'ADN nucléaire et une forte aneuploïdie ont été révélées par la cytométrie en flux, les comptages chromosomiques sur racines et les mesures de longueur de stomates, que ce soit au niveau intra ou interspécifique. Les espèces américaines présentent une quantité d'ADN nucléaire plus petite que les espèces africaines. Le vanillier a en conditions naturelles un régime mixte de reproduction. Des évènements d'hybridation interspécifiques ont pu se produire et conduire à des phénomènes d'allopolyploïdisation. A un niveau intraspécifique, des phénomènes d'autopolyploïdisation ont pu se produire soit de façon somatique (via une endopolyploïdisation), soit via des allo ou autofécondations (moins vraisemblable du fait de la structure florale du vanillier).

Pour *V. pompona*, la polyploïdisation serait un phénomène produit anciennement et les accessions étudiées auraient évolué selon deux schémas distincts : des fusions chromosomiques ou une contraction génomique selon l'appartenance sub-spécifique des accessions de ce 'complexe d'espèce' qu'est *V. pompona*.

Pour *V. planifolia*, une autopolyploïdisation s'est récemment produite et trois niveaux de ploïdie (diploïde, triploïde et tétraploïde) ont été mis en évidence chez les accessions prospectées à La Réunion. Cette étude a permis ainsi d'expliquer les particularités des deux types 'Grosse Vanille' et 'Stérile'.

La stérilité du type 'Stérile' a été vérifiée grâce à des analyses sur du pollen et elle découle vraisemblablement de sa triploïdie, entraînant une viabilité pollinique réduite (en terme de capacité de germination). A l'avenir, il sera intéressant d'obtenir ses informations sur le cultivar autostérile mexicain de *V. planifolia* 'Oreja de Burro', afin de voir si le même mécanisme (triploïdie) est à l'origine de la stérilité de ces individus (qui ont des profils génétiques différents comme montré dans l'analyse AFLP). Si tel est le cas, ceci pourrait démontrer que la triploïdie est survenue de façon indépendante dans deux zones géographiques : dans la zone d'origine (Mexique) et la zone d'introduction (La Réunion). Cette

étude a été initiée par notre collaborateur Pesach Lubinsky (UCR) suite à nos recommandations.

Il est indispensable de poursuivre les comptages chromosomiques sur pollen en fonction de la disponibilité des fleurs, ou de réaliser des mesures de longueur de stomates car ils ont été montrés comme étant de bons indicateurs de la ploïdie chez *V. planifolia*. Ces analyses devront être adaptées aux autres espèces du genre.

Ainsi, suite aux analyses génétiques et cytogénétiques, il a été possible de préciser l'origine des variations phénotypiques par rapport au type 'Classique' observées chez les types 'Aiguille', 'Grosse Vanille' et 'Stérile'. Afin d'élucider les mécanismes à l'origine de l'apparition des types 'Mexique' et 'Variegata', nous allons donc tester l'hypothèse de variations épigénétiques.

Chapitre 4

ANALYSE ÉPIGÉNÉTIQUE

VANILLE. *Vanilla.* BOT. PHAN. L'*Epidendrum Vanilla*, L., a été érigé en un genre distinct par Swartz, dans sa Flore des Indes-Occidentales. [...] Ce genre fait partie de la famille des Orchidées et de la Gynandrie Monandrie, L. Il ne renferme que deux ou trois espèces, parmi lesquelles le Vanillier, *Vanilla aromatica,* Swartz, qui fournit la substance connue dans le commerce sous le nom de Vanille, mérite une mention particulière.

Le Vanillier [...] croît spontanément dans l'Amérique équinoxiale, principalement au Mexique, dans les républiques de Colombie, du Pérou, à la Guiane, etc. Elle est cultivée dans les Antilles, au Brésil, et dans d'autres contrées des climats chauds ; elle prospère dans les sites ombragés et arrosés par des sources.

C'est le fruit de cette Plante qui forme la Vanille du commerce. Celle-ci a la forme d'une silique un peu comprimée, amincie aux deux bouts, et tronquée au sommet ; sa grosseur ordinaire est celle d'une plume de cygne ; sa longueur varie entre cinq et dix pouces ; sa couleur est brune-rougeâtre, luisante. A l'intérieur, la Vanille contient un parenchyme pulpeux, noir, dans lequel sont nichées des graines noires, brillantes et très-petites. L'odeur de cette substance est suave, balsamique ; sa saveur chaude, un peu douceâtre. Ces qualités physiques dépendent de l'huile volatile et de l'acide benzoïque qui y sont contenus ; souvent cette dernière substance forme des efflorescences cristallines à la surface du fruit. La partie pulpeuse est la seule douée de principes aromatiques.

La récolte de la Vanille se fait avant sa complète maturité ; on la fait sécher à l'ombre, et on l'enduit extérieurement d'une légère couche d'huile fixe (d'Acajou ou de Ricin), dans le but de lui donner une certaine souplesse, et d'empêcher les principes volatils de se dissiper. Enfin on dispose ces fruits, improprement nommés gousses ou siliques, par petites bottes de cinquante ou de cent, que l'on expédie en Europe après les avoir enveloppées dans des petites boîtes bien closes. On distingue dans le commerce plusieurs sortes de Vanille qui, suivant l'opinion communément adoptée par les pharmacologistes, sont dues à des variétés de la même espèce cultivée ou sauvage. Néanmoins les gousses de quelques Vanilles ont une forme tellement particulière, que des espèces distinctes du genre *Vanilla* sont susceptibles de fournir des fruits odorans à peu près semblables. La Vanille la plus estimée est celle qui a reçu le nom de *Vanilla Leq* ; elle est longue d'environ six pouces, large de trois à quatre lignes, rétrécie aux deux extrémités et courbée à sa base ; elle est un peu molle, visqueuse, d'une couleur rougeâtre foncée, et d'une odeur extrêmement suave, analogue à celle du Baume du Pérou. On lui donne le nom de Vanille givrée quand elle s'est couverte d'efflorescences d'acide benzoïque, après avoir été conservée dans un lieu sec et dans des vases qui ne sont pas hermétiquement fermés. On nomme *Vanilla Simarona* ou bâtarde, une sorte commerciale qui vient de Saint-Domingue ; elle est plus petite que la précédente, d'un brun moins foncé, moins aromatique, plus sèche, et non susceptible de se couvrir d'efflorescences. Enfin le Vanillon ou la grosse Vanille du commerce français, *Vanilla Pomprona* ou *Bova* des Espagnols, est une autre sorte dont la longueur est de cinq à sept pouces, la largeur de six à neuf lignes. Elle est très-brune, molle, visqueuse, presque toujours ouverte, d'une odeur forte, moins suave que la Vanille Leq. On l'envoie du Brésil, confite pour ainsi dire dans un liquide sucré, et renfermée dans des boîtes de fer-blanc. [...] (G..N.)

Extrait du DICTIONNAIRE CLASSIQUE D'HISTOIRE NATURELLE. Par Bory de St-Vincent. TOME SEIZIÈME. Octobre 1830. pp. 503-504.

CHAPITRE 4 : ANALYSE ÉPIGÉNÉTIQUE

I. Introduction

Le terme 'épigénétique' décrit l'ensemble des interactions existant entre les gènes et l'environnement et conduisant à l'expression phénotypique de ces gènes au cours du développement (Waddington, 1942). Aujourd'hui, ce terme désigne le plus souvent des modifications héritables réversibles de l'expression des gènes sans changement de la séquence nucléotidique (Wu et Morris, 2001; Mathieu *et al.*, 2007) comme la méthylation de l'ADN (Finnegan *et al.*, 1998), les modifications des histones et le repositionnement des nucléosomes (Verbsky et Richards, 2001), modifications qui ont des conséquences phénotypiques et évolutives (Liu et Wendel, 2003).

La méthylation de l'ADN est une modification de l'une des quatre bases azotées de l'ADN consistant en l'ajout dans l'ADN nouvellement répliqué d'un groupement méthyle à la place d'un atome d'hydrogène par l'action d'une ADN méthyltransférase (Finnegan *et al.*, 1998; Martienssen et Colot, 2001). Bien que les quatre bases puissent être chimiquement méthylées, la cytosine est la plus fréquemment méthylée, résultant en la formation de 5-méthylcytosine (^{5m}C) (Martienssen et Colot, 2001). La méthylation de l'ADN chez les plantes est restreinte au génome nucléaire et n'est pas distribuée aléatoirement mais concentrée dans les séquences répétées (Finnegan *et al.*, 1998).

La méthylation est essentielle pour le développement des plantes car elle influence la transcription de gènes (Finnegan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999; Paszkowski et Whitham, 2001) et elle est impliquée dans un certain nombre de processus biologiques comme le 'gene silencing' (Cubas *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1999; Paszkowski et Whitham, 2001), le contrôle des éléments mobiles (ADN invasifs et éléments transposables), la durée de la réplication de l'ADN, la détermination de la structure des chromosomes, l'augmentation de la fréquence des mutations (Finnegan *et al.*, 1998).

Les variabilités phénotypique et physiologique d'une plante peuvent être expliquées par une expression différentielle de certains gènes structuraux régulés par des changements épigénétiques, comme l'altération de la méthylation (Imazio *et al.*, 2002; Kalisz et Purugganan, 2004). Chez *Arabidopsis*, des niveaux réduits en méthylation de l'ADN ont entraîné une série d'anomalies dans le développement de la plante, comme une perte de dominance apicale, une stature réduite, des taille et forme des feuilles altérées, une taille de racines réduite, une transformation homéotique des organes floraux et une baisse de la fertilité (Finnegan *et al.*, 1996; Ronemus *et al.*, 1996). De même, Cuba *et al.* (1999) ont montré qu'une hyperméthylation du gène *Lcyc* était associée à l'apparition d'un type phénotypique mutant chez *Linaria vulgaris*. De nombreuses épimutations spontanées ou induites expérimentalement sont connues chez le maïs et *Arabidopsis* (Martienssen et Colot, 2001).

Les changements épigénétiques sont transmis de façon stable à la descendance (Finnegan *et al.*, 1996; Cubas *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 1999; Martienssen et Colot, 2001; Grant-Downton et Dickinson, 2006; Akimoto *et al.*, 2007) ainsi que par la multiplication végétative (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001). Occasionnellement, il y a réversion phénotypique corrélée avec la déméthylation du gène épimuté et restauration de son expression (Cubas *et al.*, 1999; Jaligot *et al.*, 2000).

Les variations naturelles de méthylation des gènes parmi des individus, ou épiallèles, affectent les niveaux d'expression des gènes, et produisent ainsi de nouveaux phénotypes héritables. Les variations épigénétiques représentent donc certainement une contribution importante dans les variations observées au niveau des populations naturelles, mais leurs conséquences évolutives sont encore mal connues, ce qui représente un nouveau champ d'investigation (Finnegan, 2001; Kalisz et Purugganan, 2004). Les phénotypes particuliers 'Mexique' et 'Variegata' rencontrés à La Réunion n'ayant pu être expliqués ni par une origine génétique, ni par une polyploïdie, nous avons donc testé si ces variations résultaient de modifications épigénétiques en étudiant la méthylation des cytosines de l'ADN.

Tableau 4.1 : Numéro d'accession, variété et provenance des 48 accessions de *V. planifolia* étudiées par MSAP.

Numéro d'accession	*Variété*	*Provenance*
PLc0217	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0218	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0219	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0343	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0344	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0345	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0457	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0458	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0459	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0563	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0564	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0565	Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0647	Classique	Réunion (St-Philippe)
PLc0650	Classique	Réunion (St-Philippe)
PLc0340	Facies Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0341	Facies Classique	Réunion (Bras-Panon)
PLc0342	Facies Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0493	Facies Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0494	Facies Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0495	Facies moins Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLgv0641	Grosse Vanille	Réunion (St-Philippe)
PLgv0643	Grosse Vanille	Réunion (St-Philippe)
PLgv0646	Grosse Vanille	Réunion (St-Philippe)
PLmg0185	Magic	Réunion (Bras-Panon)

Numéro d'accession	*Variété*	*Provenance*
PLmg0619	Magic	Réunion (Bras-Panon)
PLm0001	Mexique	Réunion
PLm0002	Mexique	Réunion
PLm0334	Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0335	Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0336	Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0337	Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0338	Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0339	Mexique	Réunion (Bras-Panon)
PLm0627	Mexique	Réunion (St-Philippe)
PLm0649	Mexique	Réunion (St-Philippe)
PLm0632	Mexique	Réunion (St-Philippe)
PLst0630	Stérile	Réunion (St-Philippe)
PLst0645	Stérile	Réunion (St-Philippe)
PLst0716	Stérile	Réunion (Ste-Rose)
PLv0057	Variegata	France (Paris)
PLv0149	Variegata	France (Lyon)
PLv0688	Variegata	Cote d'Ivoire
PLv0710	Variegata	Réunion (Ste-Rose)
PL0648		Réunion (St-Philippe)
PL0709		Réunion (St-Philippe)
PL0711		Réunion (Ste-Rose)
PL0714		Réunion (Ste-Rose)
PL0762		Maurice

Trois méthodes sont disponibles pour étudier la méthylation de l'ADN : (i) une mesure chimique de la quantité globale de cytosines méthylées au niveau du génome (Jaligot *et al.*, 2000; Chakrabarty *et al.*, 2003), (ii) une analyse de séquences génomiques traitées au bisulfite qui transforme les cytosines non-méthylées en thymidine (Fulnecek *et al.*, 1998), et (iii) une digestion enzymatique par des isoschizomères ayant une sensibilité différente à la méthylation (Reyna-López *et al.*, 1997; Baurens *et al.*, 2003). Nous avons utilisé cette troisième technique pour détecter les éventuelles variations de méthylation du génome chez le vanillier. La technique MSAP (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism) est une modification de la technique AFLP et en combine donc les avantages : visualisation d'un grand nombre de marqueurs par échantillon, observation de l'état de méthylation de cytosines à chaque site de digestion, et aucune connaissance à priori des séquences du génome.

Cette méthode a été utilisée pour analyser l'étendue et les schémas de méthylation des cytosines du riz (Xiong *et al.*, 1999), du coton (Keyte *et al.*, 2006), de la pomme (Xu *et al.*, 2000), de la banane (Baurens *et al.*, 2003), du dattier (Fang et Chao, 2007), pour rechercher le statut de méthylation de l'ADN de plantes issues de micropropagation comme la banane (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001), le palmier à huile (Jaligot *et al.*, 2000), le ginseng (Chakrabarty *et al.*, 2003), pour vérifier l'effet de la cryoconservation chez la pomme (Hao *et al.*, 2001), pour déterminer la diversité génétique du raisin (Imazio *et al.*, 2002), et pour détecter les changements dans les schémas de méthylation de l'ADN chez le blé d'hiver après traitements induisant la vernalisation (Burn *et al.*, 1993; Sheldon *et al.*, 1999).

Tableau 4.2 : Noms et séquences des adaptateurs et amorces utilisés pour l'analyse MSAP. Les adaptateurs ont été obtenus en hybridant les deux séquences numérotées 1 et 2 pour chaque site enzymatique. Les adaptateurs et amorces ont été séquencés par Applied Biosystems (Foster City, California).

Nom	**Séquence (5' - 3')**
Adaptateurs	
Ad *Eco*RI1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
Ad *Eco*RI2	AAT TGG TAC GCA GTC
Ad *Hpa*II1	GAT CAT GAG TCC TGC T
Ad *Hpa*II1	CGA GCA GGA CTC ATG A
Amorces de pré-amplification	
Eco-A	GAC TGC GTA CCA ATT CA
Hpa-A	TCA TGA GTC CTG CTC GGA
Amorces d'amplification sélective	
Eco-AC	GAC TGC GTA CCA ATT CAC
Eco-AG	GAC TGC GTA CCA ATT CAG
Hpa-ATT	ATC ATG AGT CCT GCT CGG ATT
Hpa-ATG	ATC ATG AGT CCT GCT CGG ATG
Hpa-AAC	ATC ATG AGT CCT GCT CGG AAC
Hpa-AAG	ATC ATG AGT CCT GCT CGG AAG

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal et extraction d'ADN

L'étude a été menée sur un sous-échantillon de 48 accessions (Tableau 4.1) de *V. planifolia* qui ont été précédemment analysées par AFLP (Bory *et al.*, submitted-b) et dont la variabilité phénotypique n'était pas expliquée par une variation génétique. Ce sous-échantillon comprend 24 accessions collectées dans une ombrière de la coopérative Provanille (Bras-Panon, La Réunion) des phénotypes 'Classique' et 'Mexique'. Ces 24 accessions sont en réalité huit plants répétés avec trois boutures pour chaque plant. L'idée est de vérifier que le polymorphisme de méthylation, s'il existe, est bien transmis via la multiplication végétative. Les 24 autres accessions, provenant de prospections à La Réunion et d'échanges avec des jardins botaniques, comprennent les phénotypes 'Classique', 'Mexique', 'Grosse Vanille', 'Stérile', 'Variegata' et enfin, un type particulier 'Magic' qui serait indéhiscent (B. Côme, com. pers.). Ces échantillons sont maintenus dans la collection des ressources génétiques du vanillier au CIRAD à La Réunion (Grisoni *et al.*, 2007).

L'ADN a été extrait selon le protocole de Risterucci et al. (2000) et purifié sur des spin columns 100 (Sigma, St. Louis, Missouri). Les concentrations des extraits d'ADN ont été estimées visuellement par comparaison avec des dilutions d'échantillons d'ADN de maïs de concentration connue, après migration électrophorétique sur gels d'agarose.

II.2. Analyse MSAP

La méthode MSAP a été réalisée selon le protocole de Reyna-Lopez et al. (1997). L'ADN génomique total (500 ng) a été digéré une première fois dans 50 µL contenant 20 U d'endonucléase *Eco*RI insensible à la méthylation et 2 X de tampon Tango (MBI Fermentas, Vilnius, Lituanie) pendant 2 h à 37°C. Après inactivation de

l'enzyme 15 min à 65°C, les produits de digestion ont été séparés en deux aliquots. Chaque aliquot a été digéré soit par 15 U d'endonucléase *Hpa*II, sensible à la méthylation, soit par *Msp*I, isoschizomère insensible à la méthylation (Fermentas) toute la nuit. Les enzymes ont été inactivées 15 min à 65°C. Des adaptateurs double-brin *Eco*RI et *Hpa*II (10 µM) (Tableau 4.2) ont été ligués aux produits de digestion avec 10 U de T4 DNA ligase et 1 X de tampon de réaction ligase (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) pendant 2 h à température ambiante dans un volume final de 100 µL. La préamplification a été réalisée dans un volume de 50 µL contenant 5 µL de produit de digestion-ligation dilué dans de l'eau HPLC au 1/10e, 1 X de tampon PCR (Red GoldStar, Eurogentec, Seraing, Belgique), 0.2 mM de dNTPs (NEB), 1.5 mM de $MgCl_2$ (Red GoldStar), 0.2 µM d'amorces *Eco*-A et *Hpa*-A (Applied Biosystems, Foster City, California, Tableau 4.2) et 1 U de Taq polymerase (Red GoldStar). La réaction PCR a été réalisée sur un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) selon les paramètres suivants : une étape initiale de 2 min à 72°C, un cycle de 2 min à 94°C, 25 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 56°C et 2 min à 72°C et une étape finale de 10 min à 72°C. L'amplification sélective a été réalisée dans un volume de 15 µL contenant 5 µL de produit de la préamplification dilué dans de l'eau HPLC au 1/20e, 1 X de tampon PCR, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.1 µM d'amorce *Eco*RI marquée avec un fluorochrome, 0.2 µM d'amorce *Hpa*II et 1.25 U de Taq polymerase. Huit couples d'amorces ont été utilisés (Tableau 4.2). La réaction PCR a été réalisée sur un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 selon les paramètres suivants : une étape initiale de 5 min à 94°C, 13 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 65°C et 2 min à 72°C avec une diminution de la température d'hybridation de 0.7°C par cycle, puis 24 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 56°C et 2 min à 72°C et une étape finale de 10 min à 72°C. Les données ont été obtenues après migration d'un mélange de 1 µL de produit amplifié, 10.7 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) et 0.3 µL de marqueur de taille interne GeneScanTM-5OO LIZ (Applied Biosystems) sur un séquenceur à 16 capillaires ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

L'étape de la ligation est critique car sujette à des variabilités, c'est pourquoi la duplication des échantillons est nécessaire. Afin de vérifier la stabilité des profils détectés, deux répétitions de la double-digestion *Eco*RI/*Hpa*II ont donc

Tableau 4.3 : Cas observables lors des doubles digestions. La présence de bande (1) signifie qu'il y a eu coupure et l'absence de bande (0) signifie qu'il n'y a pas eu de coupure.

	*Eco***RI**/*Hpa***II**	*Eco***RI**/*Msp***I**	**Etat de méthylation du site CCGG**
Cas N°1	1	1	CCGG
Cas N°2	1	0	^{5hm}CCGG
Cas N°3	0	1	C^{5m}CGG
Cas N°4	0	0	^{5m}C^{5m}CGG ou ^{5m}CCGG

Tableau 4.4 : Nombre de sites CCGG observés par couple d'amorces et polymorphismes correspondants.

		Couples d'amorces								
		***Eco*-AC / *Hpa*-ATT**	***Eco*-AC / *Hpa*-ATG**	***Eco*-AC / *Hpa*-AAC**	***Eco*-AC / *Hpa*-AAG**	***Eco*-AG / *Hpa*-ATT**	***Eco*-AG / *Hpa*-ATG**	***Eco*-AG / *Hpa*-AAC**	***Eco*-AG / *Hpa*-AAG**	**TOTAL**
Nombre de bandes	**Monomorphes simples**	25	23	19	22	26	23	18	32	**188**
	Monomorphes méthylées	6	5	2	3	4	6	2	3	**31**
	Polymorphes type AFLP	34	29	34	40	34	27	25	19	**242**
	Polymorphes type B	2	3	3	0	0	1	0	1	**10**
	Polymorphes type C	2	0	1	1	0	0	0	1	**5**
	Polymorphes méthylées	1	1	0	0	0	1	3	1	**7**
	TOTAL	**70**	**61**	**59**	**66**	**64**	**58**	**48**	**57**	**483**

été réalisées. Seuls les niveaux de bandes identiques entre les répétitions sont considérés pour éviter d'analyser des faux positifs.

II.3. Analyse des données

Nous avons utilisé les enzymes *Msp*I et *Hpa*II, isoschizomères coupant le même site de restriction CCGG mais présentant une sensibilité différente à la méthylation :

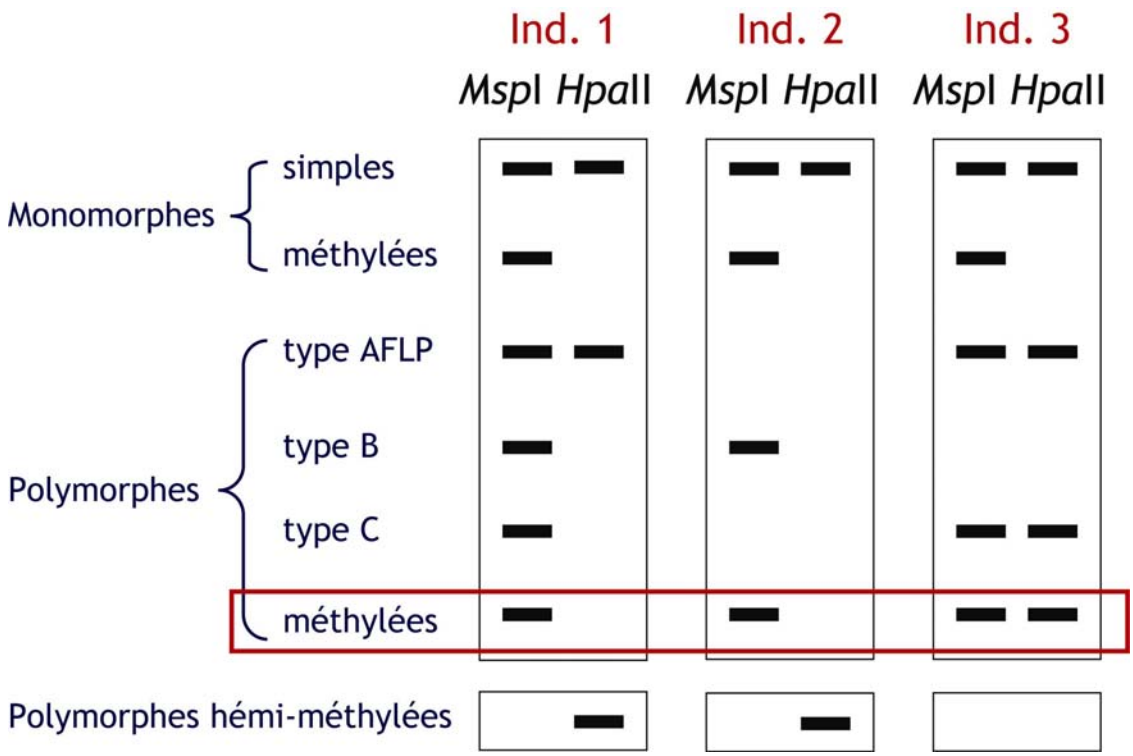
- les deux enzymes reconnaissent le site CCGG et le coupent lorsqu'il est non méthylé,
- *Hpa*II coupe aussi ce site s'il est hémi-méthylé sur la cytosine externe (un seul des deux brins est méthylé) (^{5hm}CCGG),
- *Msp*I coupe si la cytosine interne est méthylée (C^{5m}CGG), mais *Hpa*II ne la coupe pas
- *Msp*I est bloqué par l'hémi-méthylation (^{5hm}CCGG), la méthylation externe (^{5m}CCGG) et la double méthylation (^{5m}C^{5m}CGG).

La comparaison des motifs issus de l'amplification de l'ADN digéré par *Eco*RI/*Hpa*II et *Eco*RI/*Msp*I fournit des informations sur le statut de méthylation de la cytosine interne de la séquence CCGG (Tableau 4.3). Une bande présente dans le profil *Msp*I et absente dans le profil *Hpa*II traduit la méthylation de la cytosine interne. La situation contraire (bande présente en *Hpa*II et absente en *Msp*I) indique la méthylation de la cytosine externe.

Un évènement de méthylation est considéré comme polymorphe lorsqu'au moins une accession diffère des autres dans son profil.

L'alignement des bandes a été réalisé avec le logiciel GelCompar *II*, version 3.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Seules les bandes de 50 pb à 500 pb ont été codées (1 si présente, 0 si absente) et analysées.

Figure 4.1 : Profils et types de polymorphisme rencontrés.



III. Résultats

Le polymorphisme révélé dans cette étude est très complexe (Tableau 4.4). Le type AFLP correspond à la présence (ou l'absence) simultanée de bandes lors de la digestion de l'ADN par *Hpa*II et par *Msp*I. Le type B correspond à un site méthylé chez certaines accessions et muté chez d'autres, pour qui l'on n'observe donc aucune bande lors de la digestion de l'ADN par *Hpa*II et par *Msp*I. Le type C est une combinaison des deux types précédents où l'on observe de la méthylation chez certaines accessions, une absence de méthylation chez d'autres (des bandes à la fois avec *Hpa*II et *Msp*I) et la présence d'un site muté (absence de bande lors de la digestion par *Hpa*II et par *Msp*I) (Figure 4.1). Nous nous intéressons principalement aux fragments polymorphes méthylés.

Huit couples d'amorces ont été utilisés sur nos échantillons de *V. planifolia*. Entre 48 et 70 fragments sont révélés par couple d'amorces. Sur les 483 sites CCGG observés, 188 étaient non méthylés (38.9%), 31 étaient méthylés chez toutes les accessions (sites monomorphes méthylés) (6.4%), et 7 sites seulement présentaient un polymorphisme de méthylation (1.4%). Cinq accessions sont concernées par ce polymorphisme.

Les accessions PLc0340 et PLc0341 sont hypométhylées, c'est-à-dire qu'elles ont des bandes à la fois avec *Hpa*II et *Msp*I alors que les 46 autres accessions présentent ces bandes seulement avec *Msp*I. L'accession PLc0341 est hypométhylée au locus 426 pb du couple *Eco*-AC/*Hpa*-ATT et l'accession PLc0340 au locus 98 pb du couple *Eco*-AG/*Hpa*-AAC.

Les accessions PLst0645, PLm0632 et PL0711 sont hyperméthylées, c'est-à-dire qu'elles présentent certaines bandes seulement avec *Msp*I alors que pour les 45 autres accessions, ces bandes se retrouvent à la fois avec *Hpa*II et *Msp*I. L'accession PLst0645 est hyperméthylée au locus 144 pb du couple *Eco*-AC/*Hpa*-ATG ainsi qu'au locus 405 pb du couple *Eco*-AG/*Hpa*-AAC. L'accession PLm0632 est hyperméthylée au locus 205 pb du couple *Eco*-AG/*Hpa*-ATG ainsi qu'au locus 382 pb du couple *Eco*-AG/*Hpa*-AAC. Enfin, l'accession PL0711 est hyperméthylée au locus 393 pb du couple *Eco*-AG/*Hpa*-AAG.

IV. Discussion et conclusion

Nos données montrent qu'il existe de la méthylation chez *V. planifolia*, 7.8% des fragments révélés grâce aux digestions avec *Eco*RI, *Msp*I et *Hpa*II étant méthylés. Cette valeur est en accord avec le taux révélé chez la banane (7.5%, (Noyer *et al.*, 2005)) mais elles sont relativement faibles comparé à celles révélées chez d'autres plantes. Les proportions d'évènements de méthylation pour des plantes propagées de façon conventionnelle sont de 16.3% chez le riz (Xiong *et al.*, 1999), 18.4% pour d'autres bananes (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001), 25% chez la pomme (Xu *et al.*, 2000), 32% chez le coton allotétraploïde (Keyte *et al.*, 2006) et 52 à 60% chez le chou-fleur (Salmon, 2007). Les proportions d'évènements de méthylation pour des plantes issues de micropropagation sont entre 11 et 17% chez le ginseng (Chakrabarty *et al.*, 2003), entre 20.8 et 22% chez le palmier à huile (Jaligot *et al.*, 2000) et 23% pour la banane (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001). Ces valeurs sont très variables en fonction de l'espèce étudiée. Les différences entre les taux de méthylation peuvent être expliquées par les propriétés de digestion des enzymes, en particulier *Hpa*II, dépendantes du fournisseur, de la qualité de l'ADN et de l'environnement génomique (Baurens *et al.*, 2003). L'état physiologique des plants peut également entraîner de fortes différences dans les niveaux de méthylation (Fraga *et al.*, 2002). De plus, la micropropagation est connue pour induire une grande variété de changements génétiques et épigénétiques dans les régénérants appelée variation somaclonale (Kaeppler *et al.*, 2000). Elle semble être responsable d'une hyperméthylation chez les régénérants pour la banane (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001) et le ginseng (Chakrabarty *et al.*, 2003) mais également d'une hypométhylation pour le palmier à huile (Jaligot *et al.*, 2000). Des séquences comme les rétrotransposons pourraient être activées par les processus de culture de tissus (Kaeppler *et al.*, 2000; Peraza-Echeverria *et al.*, 2001).

Dans cette étude, cinq accessions ont montré un léger polymorphisme de méthylation, et nous avons observé à la fois des hyperméthylations et des hypométhylations. Alors que l'hyperméthylation est en général responsable de l'inactivité ou 'silencing' des gènes (Jacobsen *et al.*, 2000; Martienssen et Colot, 2001), l'hypométhylation provoque le développement anormal des plantes (Finnegan *et al.*, 1996; Finnegan, 2001) en activant la transcription des gènes

(Akimoto *et al.*, 2007; Fang et Chao, 2007). L'hypométhylation a été trouvée plus fréquente que l'hyperméthylation chez le maïs (Kaeppler *et al.*, 2000).

Trois accessions (Plst0645, Plm0632, PL0711) étaient hyperméthylées à quelques locus (disparition de bande en *Hpa*II) par rapport au reste des 45 accessions.

Deux accessions PLc0340 et PLc0341 du type 'Classique' étaient hypométhylées (apparition de bande en *Hpa*II) à un niveau de bande différent. Parmi les 48 accessions étudiées, nous disposions de 'triplets' pour huit plants (trois boutures par plant) afin de vérifier la transmission du polymorphisme de méthylation à travers la multiplication végétative. Les accessions PLc0340 et PLc0341 appartiennent au même 'triplet' et ont montré un polymorphisme de méthylation. Il est intéressant de noter que la troisième accession du triplet, PLc0342, n'a pas montré de déméthylation. Ainsi ces variations sont soit non transmissibles par voie végétative, soit se sont produites après le bouturage.

Certaines études ont montré que la variabilité morphologique dans des populations clonales pouvait s'expliquer par une combinaison de facteurs génétiques et épigénétiques (Imazio *et al.*, 2002). L'objectif de cette étude épigénétique était donc de vérifier cette hypothèse, pour expliquer les variations phénotypiques des types réunionnais 'Mexique' et 'Variegata' par rapport au type 'Classique' le plus courant. Nous avons donc recherché l'existence d'un polymorphisme de méthylation au sein de ces accessions. Même si un faible polymorphisme de méthylation (1.4%) a été trouvé pour certaines accessions, aucun marqueur de méthylation n'a permis de distinguer spécifiquement les types 'Mexique' et 'Variegata' du type 'Classique'. Une conclusion similaire a été obtenue au cours d'études réalisées chez la banane (Baurens *et al.*, 2005; Noyer *et al.*, 2005) et le chou-fleur (Salmon, 2007). Les bananiers Plantains montrent une grande diversité phénotypique dans leur zone de diversification secondaire au Congo mais les marqueurs moléculaires (AFLP, RAPD, RFLP, microsatellites) ont révélés une base génétique très étroite. L'étude du statut de méthylation des cytosines a montré un fort degré de polymorphisme qui ne reflétait cependant pas les variations phénotypiques observées (Baurens *et al.*, 2005; Noyer *et al.*, 2005). De même, pour tenter d'expliquer les abberrations de développement affectant la

Figure 4.2 : Réversion de la panachure des feuilles du type morphologique 'Variegata' PLv0035 (CIRAD, La Réunion). Cliché : P. Besse.

morphologie et la vigueur des plants chez le chou-fleur, la méthylation a été recherchée, mais aucun marqueur de méthylation permettant d'expliquer ces anomalies n'a été détecté (Salmon, 2007).

Notre stratégie de criblage à large échelle du polymorphisme génétique (AFLP) ou épigénétique (MSAP) n'a donc pas permis de mettre en évidence des variations génétiques ou épigénétiques pouvant expliquer de façon consistante les variations phénotypiques observées chez les types 'Mexique' ou 'Variegata'.

La variégation des feuilles (plantes 'panachées') est souvent le résultat d'une mutation se produisant dans les gènes chloroplastiques entraînant un développement anormal du chloroplaste (Tilney-Bassett, 1978) et c'est donc peut-être au niveau du génome chloroplastique que ces variations devraient être recherchées. Toutefois, chez certaines espèces comme *Hypericum androsaemum* (Olsen *et al.*, 2006b), il a été montré qu'il peut s'agir d'un caractère nucléaire récessif. Chez cette espèce, l'observation de réversions du caractère panaché a conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que la mutation responsable de ce caractère peut être due à la présence d'un élément transposable (Olsen *et al.*, 2006b). De plus, comme la vanille, tous les cultivars de clémentine dérivent d'un seul plant, sont propagées végétativement et présentent pourtant une grande variabilité morphologique non expliquée par une diversité génétique. Dans ce cas, des mutations dans les séquences des rétrotransposons ont été mises en évidence favorisant la diversification morphologique des clémentines (Bretó *et al.*, 2001). Cela pourrait être une hypothèse à vérifier chez la vanille. Plus largement, le mouvement des éléments transposables étant largement contrôlés par des méthylations (Finnegan *et al.*, 1998), une telle mutation est peut être aussi probablement le résultat indirect de phénomènes de méthylation et de déméthylation. De telles hypothèses sont en effet proposées pour expliquer la variégation des tiges de bambou *Phyllostachys* sp. (Gielis *et al.*, 2004). Ces auteurs proposent de cibler spécifiquement des transposons du type de *l'Activator Ac* du maïs. Le type 'Variegata' est un type stable transmis par reproduction végétative, mais nous avons pu observer une réversion du phénotype panaché sur la liane d'une des accessions de ce type (PLv0035) (Figure 4.2), ce qui permet de supposer que

Figure 4.3 : Types morphologiques 'Classique' (à gauche) et 'Mexique' (à droite) maintenus sous ombrière dans la collection de Provanille (St-André, La Réunion). Cliché : P. Besse.

nous pourrions être en présence chez *V. planifolia* d'un système similaire impliquant une combinaison transposon/méthylation. Une telle hypothèse pourrait être testée via une approche de type IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) ou REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) (Kalendar *et al.*, 1999) combinée à une analyse MSAP.

La variation phénotypique du type 'Mexique' est stable et héritable de façon végétative, puisque les spécificités morphologiques de ces accessions sont conservées après leur mise en collection *ex situ* (Figure 4.3). En ce qui concerne ce type 'Mexique', nous avons vraisemblablement affaire à une mutation dominante à effet pléiotropique, cette mutation pouvant avoir une origine génétique voire épigénétique. Les méthodes de criblage à haut débit utilisées ici (AFLP, MSAP) n'ont pas permis de détecter cette mutation. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de procéder à des autofécondations du type 'Mexique' ou à des croisements 'Mexique' x 'Classique' pour observer la ségrégation du caractère 'Mexique' dans la descendance (avec des proportions attendues respectivement ¾ 'Mexique' : ¼ 'Classique' ou ½ 'Mexique' : ½ 'Classique'). C'est en effet de cette façon, par exemple, qu'il a été possible de montrer chez *Coffea arabica*, que le phénotype 'Bourbon Pointu' est dû à une mutation simple, récessive, la mutation *Laurina*, à effet pléiotropique (Krug et Carvalho, 1951; Krug *et al.*, 1954). Une telle mutation n'est pas détectable par AFLP (Lécolier, 2006).

Le cas particulier de la PLm0632, trouvée en plantation à La Réunion, mérite une attention particulière. Il s'agit en réalité d'un type décrit comme 'petite Mexique', qui présente une morphologie de type 'Mexique' mais avec de petites feuilles. Elle présente par ailleurs un pollen et des fleurs pâles, évoquant sur ce point une ressemblance avec *V. bahiana*. Cette accession a montré une certaine variabilité génétique dans l'étude AFLP (elle faisait partie du groupe des 19 accessions originales, Chapitre 2, Fig. 2 dans Bory *et al.* (submitted-b)). Elle présente aussi du polymorphisme de méthylation par rapport aux autres accessions testées. Cette accession (5.18 pg) est donc morphologiquement, génétiquement et épigénétiquement originale et devra dans l'avenir recevoir une attention particulière.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'hybridation et la polyploïdisation ont joué un rôle important dans l'évolution du genre *Vanilla*. Des études récentes ont montré que les instabilités génétiques et épigénétiques pouvait affecter les génomes récemment dupliqués (Comai, 2000; Comai *et al.*, 2000; Shaked *et al.*, 2001; Kashkush *et al.*, 2002; Madlung *et al.*, 2002; Kashkush *et al.*, 2003; Salmon *et al.*, 2005). Cependant, toutes ces études ont été réalisées chez des allopolyploïdes (Liu et Wendel, 2003; Grant-Downton et Dickinson, 2006) et aucune étude n'existe sur les autopolyploïdes. Des accessions diploïdes, autotriploïdes ('Stérile') et tétraploïdes ('Grosse Vanille') ont été incluses dans l'échantillonnage de cette étude épigénétique. Il n'y a apparemment pas de différence de méthylation notable entre ces trois niveaux de ploïdie, excepté pour une accession du type 'Stérile' PLst0645. En observant les résultats de l'analyse AFLP présentée dans le Chapitre 2 (Fig. 2 dans Bory *et al.* (submitted-b)), il est intéressant de noter que cette accession présente quelques différences de profil AFLP avec les autres accessions de type 'Stérile', 'Grosse Vanille' ou 'Classique' testées. Il semblerait donc que dans certains cas, l'autotriploïdie puisse induire des remaniements d'ordre génétique ou épigénétique. Cette analyse mérite donc d'être poursuivie.

Quoiqu'il en soit une des contraintes majeures associée à la technique MSAP est que cette méthode ne recherche qu'une petite proportion des cytosines du génome. D'une part, la détection est restreinte au seul site des isoschizomères utilisés (CCGG) alors que la fréquence attendue de cette séquence dans le génome est de l'ordre de 1/256 (Xiong *et al.*, 1999). Et d'autre part, elle détecte uniquement les différences entre les sites non méthylés et les sites méthylés sur la cytosine interne ou hémi-méthylés (Baurens *et al.*, 2003). Elle ne détecte pas les différences entre les sites complètement méthylés (sur les cytosines interne et externe) ou méthylés sur la cytosine externe (qui sont pourtant relativement fréquents chez les plantes (Fulnecek *et al.*, 1998)) et les sites non méthylés ou méthylés sur la cytosine interne (Baurens *et al.*, 2003). Il serait intéressant d'évaluer directement la quantité des cytosines méthylées par séparation HPLC comme cela a été réalisé sur le palmier à huile (Jaligot *et al.*, 2000).

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

VANILLE. *Vanilla.* BOT. PH. — Genre de la famille des Orchidées, sous-ordre des Aréthusées, formé par Swartz (*Flor. Ind. occident.,* vol. III, pag. 1518) pour des plantes herbacées qui croissent en Amérique et dans l'Asie tropicale, soit dans les fissures des rochers, soit surtout en grimpant très haut sur les arbres. [...]

L'histoire des espèces de ce genre qui fournissent la Vanille du commerce, a été fort longtemps enveloppée d'obscurité ; et, même aujourd'hui, elle laisse beaucoup à désirer sous plusieurs rapports. Swartz, ayant observé une espèce à pulpe parfumée, avait supposé que c'était elle qui donnait la Vanille du commerce ; il l'avait nommé *Vanilla aromatica.* Elle correspondait à l'*Epidendrum Vanilla*, Lin. Tous les auteurs de matière médicale et autres ont suivi Swartz ; et nous voyons aujourd'hui encore, dans des ouvrages de publication toute récente, la Vanille du commerce indiquée comme provenant du *Vanilla aromatica*, Swartz. Cependant cette espèce ne croît que dans l'Amérique méridionale et particulièrement au Brésil, tandis que le commerce tire surtout sa Vanille du Mexique. A peine une faible quantité de Vanille préparée d'une manière particulière arrive-t-elle du Brésil en Portugal. Aussi M. Lindley (*Orchid.* pag. 434) dit-il avec raison : « Il ne paraît pas qu'aucune des Vanilles du Brésil forme la substance connue dans le commerce ; on peut présumer certainement que le *Vanilla aromatica* n'a aucun rapport avec les fruits qui sont dans le commerce. » [...]

Quant aux Vanilles du Mexique, la plus connue est la VANILLE A FEUILLES PLANES, *Vanilla planifolia*, Andr. (*Botan. Reposit.*, tab. 538), dont la tige acquiert une grande longueur en grimpant sur les arbres ; dont les feuilles sont oblongues-lancéolées, planes, légèrement striées ; dont les fleurs blanches-verdâtres ont les folioles du périanthe oblongues, dressées, un peu obtuses, et le labelle échancré, crénelé, crispé, recourbé des deux côtés, relevé dans son milieu de lamelles courtes, transversales, dentées. Ses fruits sont cylindracés et très longs. C'est cette espèce qu'on cultive avec succès dans nos serres chaudes. Dès 1836, M. Morren, de Liège, en ayant fécondé les fleurs artificiellement, en a obtenu un grand nombre de belles capsules remplies d'une pulpe au moins aussi parfumée que celle qui nous vient du Mexique ? Depuis cette époque, divers horticulteurs ont reconnu, non seulement qu'il est facile d'obtenir ainsi la fructification de la Vanille, mais encore que les produits qu'elle donne alors sont de qualité supérieure. M. Morren a même démontré par l'expérience la possibilité d'établir en Europe des vanillières d'un très bon rapport. La Vanille à feuilles planes a été importée, dans ces dernières années, dans les îles de l'archipel Indien, et c'est de l'Angleterre que sont partis les pieds qui ont servi à gratifier ces contrées de ce précieux végétal. Il est très probable que c'est encore cette espèce qui fournit la plus grande partie de la Vanille du commerce. Néanmoins M. Schiede a signalé (*in Linnœa*, vol. IV, p. 573) deux autres espèces dont les fruits seraient mêlés dans le commerce à ceux de la précédente ; ce sont : le *Vanilla sativa*, nommé dans le pays *Baynilla mansa*, dont les feuilles sont oblongues, charnues, les fruits sans sillons, et le *Vanilla sylvestris*, à feuilles oblongues lancéolées, et dont les capsules sont creusées de deux sillons. Mais ces plantes sont très imparfaitement connues, et la dernière particulièrement est regardée par M. Morren comme un simple synonyme de la Vanille à feuilles planes. [...] (P. D.)

Extrait du DICTIONNAIRE UNIVERSEL D'HISTOIRE NATURELLE. Par Charles d'Orbigny. TOME TREIZIÈME. 1849. pp. 3-4.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. Conclusions

L'objectif de cette thèse était d'analyser la diversité de *Vanilla planifolia* dans ses zones d'introduction en particulier à La Réunion et d'en élucider les mécanismes génétiques à l'origine de la variabilité phénotypique.

La majorité des *V. planifolia* cultivées dans l'Océan Indien (La Réunion, Madagascar) et dans les autres zones d'introductions étudiées au cours de cette thèse (Antilles, Polynésie française) ont évolué à partir d'une base génétique très étroite issue d'un seul génotype introduit en provenance du Mexique, probablement du type 'Mansa'. Les *V. planifolia* réunionnaises ont principalement évolué par l'accumulation de mutations ponctuelles pendant deux siècles de propagation végétative. La découverte du phénotype 'Aiguille' à La Réunion a mis en évidence l'intervention, certes rare, de la reproduction sexuée, mais contribuant aussi à la diversification des *V. planifolia* réunionnaises. La polyploïdie y a également joué un rôle important puisque les types 'Stérile' et 'Grosse Vanille' triploïdes et tétraploïdes, respectivement, ont été découverts. A la fin de cette thèse, l'origine de la morphologie des types 'Mexique' et 'Variegata' reste encore inexpliquée. Une approche basée respectivement sur l'étude de la ségrégation des caractères et sur l'étude des rétrotransposons permettrait peut-être d'y répondre.

Il serait intéressant de comparer les schémas de diversification des *V. planifolia* dans la zone d'introduction de l'Océan Indien avec ceux de sa zone d'origine. Les origines historiques et évolutives de *V. planifolia* au Mexique sont en cours d'étude dans le cadre d'une thèse par notre collègue Pesach Lubinsky (UCR ; (Lubinsky, 2007)). Notamment, des informations devraient être obtenues sur l'origine du cultivar mexicain 'Oreja de Burro' afin de vérifier si son autostérilité est expliquée par le même mécanisme de triploïdie que celui du type réunionnais 'Stérile'. Si tel était le cas, ceci démontrerait que la triploïdie est survenue de façon indépendante dans ces deux zones géographiques.

V. tahitensis, dans l'Océan Pacifique et également sous un régime de reproduction végétative prédominante, semble avoir évolué selon des schémas de diversification similaires à ceux de *V. planifolia*, par des mutations somatiques et de la polyploïdie. Une étude plus approfondie sur la diversité génétique et les schémas d'introduction de cette espèce d'origine énigmatique est menée par notre collègue Sandra Andrzejewski dans le cadre de sa thèse (EVT, Polynésie française).

V. pompona, sous un régime mixte de reproduction (végétative et sexuée), dans sa zone d'origine (Amérique centrale) a évolué différemment de *V. planifolia*, d'une part par des mutations somatiques et d'autre part par une intervention plus importante de la reproduction sexuée. Cette espèce est de plus un polyploïde ancien ce qui la rend particulièrement intéressante pour les études d'évolution du genre *Vanilla*. Les accessions de *V. pompona* montrent une diversité importante et pourraient constituer un complexe d'espèces (Soto Arenas, 2006a). Pour une analyse plus approfondie de ce groupe, il sera alors nécessaire de préciser la position taxonomique des accessions spontanées étudiées, notamment à partir de leur morphologie florale.

V. bahiana a évolué de façon similaire à *V. pompona*, par des mutations somatiques conservées par la reproduction végétative et par réassortiment de ses caractères du fait d'une reproduction sexuée importante. Son statut d'espèce spontanée/sauvage la rend particulièrement intéressante pour vérifier son comportement vis-à-vis de la polyploïdisation et de l'hybridation et le comparer à celui des espèces *V. planifolia* et *V. pompona*.

Ce travail de thèse a montré qu'il ne semble pas y avoir de barrière majeure aux croisements génétiques naturels entre *V. pompona* et *V. odorata*, *V. pompona* et *V. bahiana*, ainsi qu'entre *V. bahiana* et *V. planifolia*. Ce résultat s'ajoute aux signalements d'autres hybridations naturelles dans le genre (Nielsen et Siegismund, 1999; Nielsen, 2000; Lubinsky, 2004; Lubinsky *et al.*, 2006) et le succès des hybridations interspécifiques artificielles, même entre des espèces de *Vanilla* distantes (Delassus, 1960; Dequaire, 1976; FOFIFA, 1990; Minoo *et al.*, 2006b). Ces résultats très importants pourraient expliquer les difficultés rencontrées dans la

délimitation et l'identification précise des espèces et dans la préparation d'une révision correcte de la taxonomie du genre *Vanilla* (Soto Arenas, 2003; Bory *et al.*, 2007).

II. Perspectives

Comme nous l'avons montré dans cette thèse et comme beaucoup d'autres espèces tropicales introduites pour leur culture, *V. planifolia* possède une base génétique très restreinte qui la rend vulnérable aux aléas environnementaux. Chez cette plante d'une grande importance économique, l'accroissement de la variabilité génétique et l'apport de nouvelles potentialités sont des enjeux majeurs pour la recherche. L'autofécondation peut être envisagée pour l'amélioration car nous avons montré qu'elle présentait un fort potentiel pour élargir la diversité en terme de combinaisons génétiques (Bory *et al.*, submitted-b). La polyploïdie pourrait être également exploitée, en particulier pour vérifier si les types autotétraploïdes ont des caractéristiques agronomiques ou organoleptiques plus intéressantes que les individus diploïdes.

Une meilleure connaissance des espèces du pool génétique secondaire et de leurs mécanismes de diversification (hybridation interspécifique, autofécondation et polyploïdisation) est indispensable pour diversifier les vanilliers cultivés en recherchant dans ces espèces des sources de résistances aux maladies, aux virus et aux ravageurs, et pour l'amélioration de la qualité des gousses et des performances agronomiques.

Le vanillier peut être considéré comme appartenant à un groupe d'organismes taxonomiquement complexes (TCG, 'taxonomically complex group') au sens défini par Ennos *et al.* (2005), en raison de la délimitation ambiguë des espèces, de la menace d'extinction de certaines espèces, de la reproduction uniparentale (multiplication végétative prédominante) et de l'importance des phénomènes de polyploïdisation et d'hybridation. Les programmes de conservation traditionnels ne peuvent donc pas se limiter à la seule conservation des espèces menacées mais ils doivent s'appuyer sur une élucidation et une conservation des

processus évolutifs à l'origine de la biodiversité de ses espèces (Ennos *et al.*, 2005). Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont ainsi contribué à une meilleure connaissance des mécanismes régissant la diversification des espèces du genre *Vanilla* ce qui permettra de mieux orienter les stratégies de conservation des ressources génétiques.

De futurs projets devront concerner la poursuite de l'élucidation des mécanismes à l'origine de la diversification de *V. planifolia*, en précisant les données obtenues par exemple sur les mécanismes de stérilité via la triploïdie, mais aussi en poursuivant la recherche des mécanismes à l'origine des types 'Variegata' et 'Mexique'. Par ailleurs, il a été démontré dans cette thèse que les mécanismes de diversification incluent la polyploïdisation et l'hybridation, qui devront donc être évaluées plus largement à l'échelle du genre *Vanilla*. En ce sens, il apparaît indispensable de compléter la phylogénie du genre, de tels travaux ayant été amorcés à l'UMR PVBMT dans le cadre d'un stage de Master 2e année (Bouetard, 2007). Cette phylogénie devra s'appuyer non seulement sur des marqueurs cytoplasmiques transmis maternellement, mais aussi sur des marqueurs nucléaires. Elle devra aussi largement prendre en compte les données de cytogénétique et d'hybridations.

En particulier, l'aphyllie pourrait être un futur thème de recherche. Sur les 18 espèces aphylles recensées dans le genre *Vanilla*, les sept espèces endémiques de l'Océan Indien ont été décrites comme étant les plus primitives (Portères, 1954). Une étude récente (Bouetard, 2007) a démontré avec certitude la spéciation paraphyllétique des *Vanilla* aphylles démontrant que l'aphyllie serait apparue à trois moments différents pour donner les Aphyllae asiatiques, caribéennes et africaines (Soto Arenas, 2003; Bouetard, 2007). Eclaircir l'origine de ces espèces aphylles par rapport aux autres espèces du genre *Vanilla* contribuerait à élucider l'origine et l'évolution de l'acquisition d'un caractère adaptatif majeur des angiospermes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agrawal DC, Morwal GC, Mascarenhas AF. 1992. *In vitro* propagation and slow growth storage of shoot cultures of *Vanilla walkeriae* Wight - an endangered orchid. *Lindleyana* **7**: 95-99.

Akimoto K, Katakami H, Kim H-J, Ogawa E, Sano CM, Wada Y, Sano H. 2007. Epigenetic Inheritance in Rice Plants. *Annals of Botany* **100**: 205-217.

Amsellem L, Noyer J-L, Le Bourgeois T, Hossaert-Mckey M. 2000. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* **9**: 443-455.

Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbo J, Arus P. 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* **121**: 87-92.

Arends JC, Van Der Laan FM. 1986. Cytotaxonomy of Vandeae. *Lindleyana* **1**: 33–41.

Arumuganathan K, Earle ED. 1991a. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 229-233.

Arumuganathan K, Earle ED. 1991b. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 208-218.

Athwal DS, Phul PS, Minocha JL. 1967. Genetic male sterility in wheat. *Euphytica* **16**: 354-360.

Baurens F-C, Bonnot F, Bienvenu D, Causse S, Legavre T. 2003. Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome. *Plant Molecular Biology Reporter* **21**: 339-348.

Baurens F-C, Tomekpe K, Noyer J-L. 2005. Assessing the genetic diversity of *Musa* in Congo Basin. *Molecular Markers for Allele Mining*, MS Swaminathan Research Foundation, Chennai, India, 22–26 August 2005.

Beck SL, Dunlop RW, Fossey A. 2003. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 177-181.

Belling J. 1921. The behavior of homologous chromosomes in a triploid *Canna*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **7**: 197-201.

Belling J, Blakeslee AF. 1923. The reduction division in haploid, diploid, triploid and tetraploid daturas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **9**: 106-111.

Benjamini Y, Yekutieli D. 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* **29**: 1165–1188.

Bennett MD, Leitch IJ. 2005. Genome size evolution in plants. In: Gregory TR, ed. *The Evolution of the Genome*. Elsevier Academic Press, 89-162.

Bennett MD, Smith JB. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series Biological Sciences* **334**: 309-345.

Bennetzen JL, Ma J, Devos KM. 2005. Mechanisms of Recent Genome Size Variation in Flowering Plants. *Annals of Botany* **95**: 127–132.

Besse P, Da Silva D, Bory S, Grisoni M, Le Bellec F, Duval M-F. 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science* **167**: 379-385.

Blanca JM, Prohens J, Anderson GJ, Zuriaga E, Canizares J, Nuez F. 2007. AFLP and DNA sequence variation in an Andean domesticate, pepino (*Solanum muricatum,* Solanaceae): implications for evolution and domestication. *American Journal of Botany* **94**: 1219-1229.

Borda EL, Shepherd GJ, Semir J. 1999. Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occuring in Brazilian 'campo rupestre' vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 205-214.

Bory S, Catrice O, Brown SC, Leitch IJ, Gigant R, Chiroleu F, Grisoni M, Duval M-F, Besse P. submitted-a. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Annals of Botany*.

Bory S, Da Silva D, Risterucci A-M, Grisoni M, Besse P, Duval M-F. 2008. Development of microsatellite markers in cultivated *Vanilla*: polymorphism and transferability to other *Vanilla* species. *Scientia Horticulturae* **115**: 420–425.

Bory S, Grisoni M, Duval M-F, Besse P. 2007. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. *Genetic Resources and Crop Evolution*: doi:10.1007/s10722-10007-19260-10723.

Bory S, Lubinsky P, Risterucci A-M, Noyer J-L, Grisoni M, Duval M-F, Besse P. submitted-b. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *American Journal of Botany*.

Bouetard A. 2007. *Utilisation de marqueurs chloroplastiques pour l'identification spécifique et l'élucidation des relations phylogénétiques au sein du genre Vanilla*. Rapport de stage, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.

Bouriquet G. 1954. *Le vanillier et la vanille dans le monde. Encyclopédie Biologique XLVI.* Paris VI: Lechevalier.

Box GEP, Cox DR. 1964. An analysis of transformations (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society B* **26**: 211–252.

Brandham P. 1999. Cytogenetics. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. *Genera orchidacearum : General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae*. Vol. 1. USA: Oxford University Press, 67-80.

Bretagnolle F, Thompson JD. 1995. Gametes with the Stomatic Chromosome Number: Mechanisms of Their Formation and Role in the Evolution of Autopolypoid Plants. *New Phytologist* **129**: 1-22.

Bretó MP, Ruiz C, Pina JA, Asíns MJ. 2001. The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**: 285-293.

Brewbaker JI. 1957. Pollen cytology and self incompatibility systems in plants. *The Journal of Heredity*: 271-277.

Brown SC, Bory S, Andrzejewski S, Catrice O, Siljak-Yakovlev S, Duval M-F, Besse P, Dron M, Wong M. 2007. Progressively Partial Endoreplication during Development in *Vanilla* and Orchids. *7e Colloque National de la Société Française de Biologie Végétale*, Versailles, France, 12-14 September 2007.

Brownell R. 2006. State of the Industry: 2006 and Beyond. Forecasting opportunities and threats on the road to recovery. *Perfumer and Flavorist* **31**: 24-27.

Brush SB. 2004. *Farmer's Bounty: Locating Crop Diversity in the Contemporary World.* New Haven: Yale University Press.

Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ. 1993. DNA methylation, venalization, and the initiation of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 287-291.

Burnham CR, Phillips RL, Albertsen MC. 1981. Inheritance of male sterility in flax involving nuclear-cytoplasmic interaction, including methods of testing for cytoplasmic restoration. *Crop Science* **21**: 659-663.

Buteler MI, Jarret RL, La Bonte DR. 1999. Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. *Theoretical and Applied Genetics* **99**: 123-132.

Cabrita LF, Aksoy U, Hepaksoy S, Leitào JM. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Scientia Horticulturae* **87**: 261-273.

Cameron KM. 1999. Biogeography of Vanilloideae (Orchidaceae). *XVI International Botanical Congress, Abstracts*, St Louis, Missouri.

Cameron KM. 2000. Gondwanan biogeography of Vanilloideae (Orchidaceae). *3rd Southern Connection Congress, Programmes and Abstracts, p. 25-26*, Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 17-22 January 2000.

Cameron KM. 2003. Vanilloideae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. *Genera orchidacearum: Orchidoideae*. Vol. 3. USA: Oxford University Press, 281-285.

Cameron KM. 2005. Recent Advances in the Systematic Biology of *Vanilla* and Related Orchids (Orchidaceae: subfamily Vanilloideae). *First International Congress*, Princeton, NJ, USA, 11-12 November 2003.

Casas A, Cruse-Sanders J, Morales E, Otero-Arnaiz A, Valiente-Banuet A. 2006. Maintenance of Phenotypic and Genotypic Diversity in Managed Populations of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) by Indigenous Peoples in Central Mexico. *Biodiversity and Conservation* **15**: 879-898.

Castillo Martinez R, Engleman EM. 1993. Caracterizacion de dos tipos de *Vanilla planifolia*. *Acta Botánica Mexicana* **25**: 49-59.

Catrice O, Coba de la Peña T, Brown SC. 2006. Chapitre 12. Applications en biologie végétale : contraintes, succès, espoirs. In: Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Bounonnat J, eds. *La cytométrie en flux*. Paris: Lavoisier, 235-253.

Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY. 2003. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleuterococcus senticosus*). *Plant Science* **165**: 61-68.

Chambers JM. 1992. Chapter 4: Linear models. In: Chambers JM, Hastie TJ, eds. *Statistical Models in S*. Wadsworth & Brooks/Cole.

Chardard R. 1963. Contribution à l'étude cyto-taxinomique des orchidées. *Revue de Cytologie et de Biologie Végétales* **26**: 1-58.

Chavarriaga-Aguirre P, Maya MM, Bonierbale MW, Kresovich S, Fregene MA, Tohme J, Kochert G. 1998. Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 493-501.

Chen ZJ, Ni Z. 2006. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *BioEssays* **28**: 240-252.

Cibrian Jaramillo A. 1999. *Variacion genética de Vanilla planifolia en México*. Master's thesis, UNAM, México City.

Comai L. 2000. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology* **43**.

Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-David R, Reynolds SH, Stevens Y, Byers B. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. *The Plant Cell* **12**: 1551-1567.

Cordeiro GM, Pan YB, Henry RJ. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science* **165**: 181-189.

Correll DS. 1953. Vanilla, botany, history, cultivation and economic importance. *Economic Botany* **7**: 291-358.

Cubas P, Vincent C, Coen E. 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* **401**: 157-161.

D'Amato F. 1947. Nuove ricerche embriologiche e cariologiche sul genere *Euphorbia*. *Nuovo Giorn. bot. Ital.* **53**: 405-436.

De Vienne D, Causse M, Maurice A, Santoni S. 1998. *Les marqueurs moléculaires et leurs applications. Biotechnologies végétales*. Rennes: CNED.

De Wet JMJ. 1980. Origins of polyploids. In: Lewis WH, ed. *Polyploidy: biological relevance*. New York, USA: Planum Press, 199-214.

De Block M, Debrouwer D, Moens T. 1997. The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 125-131.

Delassus M. 1960. La lutte contre la fusariose du vanillier par les méthodes génétiques. *L'Agronomie Tropicale* **15**: 245-246.

Dequaire J. 1976. L'amélioration du vanillier à Madagascar. *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée* **23**: 140-158.

Duroc Y. 2004. *Etude des relations structure-fonction de la protéine ORF138 responsable de la stérilité mâle cytoplasmique Ogura.* These de Doctorat, Université de Paris Sud, Orsay.

Duval M-F, Bory S, Andrzejewski S, Grisoni M, Besse P, Causse S, Charon C, Dron M, Odoux E, Wong M. 2006. Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire. *Les Actes du BRG* **6**: 181-196.

Dvorak J. 2004. Polyploidy. In: Dekker M, ed. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. New York, 1038-1041. doi: 1010.1081/E-EPCS 120005591.

East EM, Mangelsdorf AJ. 1926. Studies on self-sterility VII. Heredity and selective pollen-tube growth. *Genetics* **11**: 466-481.

Ecott T. 2004. *Vanilla: Travels in search of the Luscious Substance*. London, GB: Penguin books.

Elias M, Mühlen GS, Mckey D, Roa AC, Tohme J. 2004. Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot Esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. *Economic Botany* **58**: 242-256.

Elias M, Panaud O, Robert T. 2000. Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity* **85**: 219-230.

Emshwiller E. 2006. Evolution and conservation of clonally propagated crops: insights from AFLP data and folk taxonomy of the Andean tuber oca (*Oxalis tuberosa*). In: Motley TJ, Zerega N, Cross H, eds. *Darwin's Harvest: New Approaches to the Origins, Evolution and Conservation of Crops*. New York: Columbia University Press, 308-333.

Emshwiller E, Doyle JF. 2002. Origins of domestication and polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast-expressed glutamine synthetase data. *American Journal of Botany* **89**: 1042-1056.

Ennos RA, French GC, Hollingsworth PM. 2005. Conserving taxonomic complexity. *Trends in Ecology and Evolution* **20**: 164-168.

Fang JG, Chao CT. 2007. Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism in Date Palms (Phoenix dactylifera L.) and their Off-Shoots. *Plant Biology (Stuttgart)* **9**: 526-533.

Farreyrol K. 2005. *Charaterisation and detection of viruses (Cucumovirus, Potyvirus) infecting vanilla in Reunion Island and Polynesian Islands*. Thesis, The University of Auckland, Auckland.

Farreyrol K, Pearson MN, Grisoni M, Leclerc-Le Quillec F. 2001. Severe stunting of *Vanilla tahitensis* in French Polynesia caused by Cucumber mosaic virus (CMV), and the detection of the virus in *V. fragrans* in Reunion Island. *Plant Pathology* **50**: 414.

Fay MF, Krauss SL. 2003. Orchid conservation genetics in the molecular age. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid Conservation*. Borneo: Natural History Publications, 91-112.

Finnegan EJ. 2001. Epialleles - a source of random variation in times of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 101-106.

Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES. 1998. DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 223-247.

Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**: 8449-8454.

FOFIFA. 1990. Le vanillier. *Bilan de la Recherche Agricole à Madagascar*: 112-119.

Fraga MF, Cañal MJ, Rodriguez R. 2002. Phase change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiata* D. Don. *Planta* **215**: 672-678.

Fulnecek J, Matyášek R, Kovarík A, Bezdek M. 1998. Mapping of 5-methylcytosine residues in Nicotiana tabacum 5S rRNA genes by genomic sequencing. *Molecular Genetics and Genomics* **259**: 133-141.

Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**: 1049-1051.

Garnatje T, Garcia S, Vilatersana R, Valles J. 2006. Genome size variation in the genus *Carthamus* (Asteraceae, Cardueae): Systematic implications and additive changes during allopolyploidization. *Annals of Botany* **97**: 461–467.

Geitler L. 1939. Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. *Chromosoma* **1**: 1-22.

Gielis J, Colpaert N, Van Den Broeke C, Kyndt T, Gheysen G. 2004. AFLP-Technology for Bamboo Research: One Marker System for a Variety of Applications. *Proceedings of the 7th World Bamboo Congress*, New Delhi, India, 27 February - 4 March 2004.

Gordon AD. 1999. *Classification*. Second Edition ed. Chapman and Hall / CRC, London.

Grant V. 1981. *Plant Speciation*. 2nd ed. New York: Columbia University Press.

Grant-Downton RT, Dickinson HG. 2006. Epigenetics and its Implications for Plant Biology 2. The 'Epigenetic Epiphany': Epigenetics, Evolution and Beyond. *Annals of Botany* **97**: 11–27.

Greilhuber J. 2005. Intraspecific Variation in Genome Size in Angiosperms: Identifying its Existence. *Annals of Botany* **95**: 91–98.

Greilhuber J, Dolezel J, Lysak MA, Bennett MD. 2005. The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms 'Genome Size' and 'C-Value' to Describe Nuclear DNA Contents. *Annals of Botany* **95**: 255–260.

Griffith MP. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* **91**: 1915-1921.

Grisoni M, Davidson F, Hyrondelle C, Farreyrol K, Caruana ML, Pearson MN. 2004. Nature, incidence, and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. *Plant Disease* **88**: 119-124.

Grisoni M, Moles M, Besse P, Bory S, Duval M-F, Kahane R. 2007. Towards an international plant collection to maintain and characterize the endangered genetic resources of vanilla. *Acta Horticulturae (ISHS)* **760**: 83-91.

Gustafsson S. 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology* **9**: 1863–1872.

Hagsater E, Soto Arenas MA, Salazar Chavez GA, Jimenez Machorro RL, Lopez Rosas MA, Dressler RL. 2005. *Orchids of Mexico.* Mexico City: Productos Farmacéuticos.

Hao Y-J, Liu Q-L, Deng X-X. 2001. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. *Cryobiology* **43**: 46-53.

Harvey CF, Rattenbury JA. 1985. Microsporogenesis and pollen viability in New Zealand taxa of *Pomaderris* Labill. (Rhamnaceae). *New Zealand Journal of Botany* **23**: 321-330.

Heim P. 1954. Le noyau dans le genre *Vanilla*. In: Lechevalier P, ed. *Le vanillier et la vanille dans le monde*. Paris, 27-43.

Hermsen JG. 1968. A discussion on cytoplasmic restoration of ms-sterility. *Euphytica* **Suppl. 1**: 63-67.

Hieter P, Griffith T. 1999. Polyploidy- more is more or less. *Science* **285**: 210-211.

Hoffmann KM. 1929. Zytologische Studien der Orchidaceen (Vorläufige Mitteilung.). *Berichte Deutsche Botanische Gesellschaft* **47**: 321-326.

Hoffmann KM. 1930. Beiträge zur Cytologie des Orchidaceen. *Planta* **10**: 523-595.

Hope ACA. 1968. A simplified Monte Carlo significance test procedure. *Journal of the Royal Statistical Society B* **30**: 582–598.

Hurel-Py G. 1938. Etude des noyaux végétatifs de *Vanilla planifolia*. *Revue de Cytologie et de Cytophysiologie Végétales* **3**: 129-133.

Imazio S, Labra M, Grassi F, Winfield M, Bardini M, Scienza A. 2002. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding* **121**: 531-535.

Jacobsen SE, Sakai H, Finnegan EJ, Cao X, Meyerowitz EM. 2000. Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Current Biology* **10**: 179-186.

Jaligot E, Rival A, Beulé T, Dussert S, Verdeil J-L. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* **19**: 684-690.

Jarne P, Lagoda PJL. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* **11**: 424-429.

Johnson MTJ, Husband BC, Burton TL. 2003. Habitat differentiation between diploid and tetraploid *Galax urceolata* (Diapensiaceae). *International Journal of Plant Sciences* **164**: 703–710.

Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevschi A, Marmiroli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* **3**: 381-390.

Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, Baulcombe DC. 1999. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *The Plant Cell* **11**: 2291-2301.

Jones WE, Kuehnle AR, Arumuganathan K. 1998. Nuclear DNA content of 26 Orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany* **82**: 189-194.

Joubès J, Chevalier C. 2000. Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 735–745.

Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y. 2000. Epigenetics aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 179-188.

Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A. 1999. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* **98**: 704-711.

Kalisz S, Purugganan MD. 2004. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **19**: 309-314.

Kao TH, McCubbin AG. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**: 12059-12065.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2002. Gene Loss, silencing and activation in a newly synthesized Wheat allotetraploid. *Genetics* **160**: 1651-1659.

Kashkush K, Feldman M, Levy AA. 2003. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* **33**: 102-106.

Kausch AP, Horner HT. 1984. Increased nuclear DNA content in raphide crystal idioblasts during development in *Vanilla planifolia* L. (Orchidaceae). *European Journal of Cell Biology* **33**: 7-12.

Kelly JK, Rasch A, Kalisz S. 2002. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany* **89**: 1021-1023.

Keyte AL, Percifield R, Liu B, Wendel JF. 2006. Infraspecific DNA Methylation Polymorphism in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Heredity* **97**: 444–450.

Khadari B, Lashermes P, Kjellberg F. 1995. RAPD fingerprints for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes. *Journal of Genetic Breeding* **49**: 77-86.

Kihara H. 1967. Cytoplasmic male sterility in relation to hybrid wheat breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **37**: 86-93.

Klindworth DL, Williams ND, Maan SS. 2002. Chromosomal Location of Genetic Male Sterility Genes in Four Mutants of Hexaploid Wheat. *Crop Science* **42**: 1447-1450.

Kouri E. 2004. *A Pueblo Divided: Business, Property, and Community in Papantla, Mexico.* Stanford: Stanford University Press.

Krauss SL. 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* **9**: 1241-1245.

Krug CA, Carvalho A. 1951. The genetics of coffea. *Advances in Genetics* **4**: 127-158.

Krug CA, Carvalho A, Antunes Filho H. 1954. Genetica de Coffea XXI. Hereditariedade dos caracteriscos de *Coffea arabica* L. var. *laurina* (Smeathman) DC. *Bragantia* **13**: 247-255.

Kudo N, Kimura Y. 2001. Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some Brassica species. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 104–110.

Kurpko S, Israelstam GF, Martinovic B. 1954. Embryo sac development and chromosome number in *Vanilla roscheri* from Inhaca Island. *South African Journal of Science* **51**.

Larsen K. 1966. Studies in the Flora of Thailand 40. Cytology of Vascular Plants II. *Dansk Botanisk Arkiv* **23**: 375-399.

Le Bellec F. 2005. Les principaux systèmes de culture du vanillier (*Vanilla planifolia*). In: CIRAD, ed. *Journées annuelles du FLHOR*, Montpellier, 4-6 July 2005.

Leclerc-Le Quillec F, Rivière C, Lagorce A. 2001. Spread of Cymbidium Mosaïc Potexvirus and potyviruses in vanilla plants grown in shade houses in Reunion Island. *Fruits* **56**: 249-260.

Leclercq P. 1969. Une stérilité mâle cytoplasmique chez le tournesol. *Annales d'Amélioration des plantes* **19**: 99-106.

Lécolier A. 2006. *Caractérisation de certains impacts de la mutation Laurina chez Coffea arabica L. aux niveaux histo-morphologique et moléculaire*, Université de La Réunion, St-Denis.

Leitch IJ, Bennett MD. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 651–663.

Lewis WH. 1980. Polyploidy in angiosperm : Dicotyledons. In: Lewis WH, ed. *Polyploidy: Biological Relevance*. New York: Plenum Press, 241-268.

Lim WL, Loh CS. 2003. Endopolyploidy in *Vanda* Miss Joaquim (Orchidaceae). *New Phytologist* **159**: 279–287.

Liu B, Wendel JF. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 365–379.

Loeillet D. 2003. Le marché international de la vanille. *FruitTrop* **98**: 4-7.

Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C. 2006. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany* **98**: 515-527.

Lubinsky P. 2004. Vanilla diversity in Mexico. In: Bakto Flavors, Rutgers University, eds. *Vanilla 2004 Europe, Second International Congress*, Cannes, France, 30 September-01 October 2004.

Lubinsky P. 2007. *Historical and evolutionary origins of cultivated vanilla.* PhD thesis, University of California, Riverside.

Lubinsky P, Van Dam M, Van Dam A. 2006. Pollination of *Vanilla* and evolution in Orchidaceae. *Lindleyana* **75**: 926-929.

Lucas R. 1990. *La Réunion, île de Vanille*. Océan Editions, St André, La Réunion.

Lüttge U, Kluge M, Bauer G. 2002. *Botanique*. Paris: Tec & Doc.

Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L. 2002. Remodeling of DNA Methylation and Phenotypic and Transcriptional Changes in Synthetic Arabidopsis Allotetraploids. *Plant Physiology* **129**: 733–746.

Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics* **38**: 948-952.

Marie D, Brown SC. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for seventy species. *Biology of the Cell* **78**: 41-51.

Martienssen RA, Colot V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* **293**: 1070-1074.

Martin FW. 1963. Chromosome number and behavior in a *Vanilla* hybrid and several *Vanilla* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **90**: 416-417.

Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**: 421-423.

Mathieu O, Reinders J, Caikovski M, Smathajitt C, Paszkowski J. 2007. Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **130**: 851-862.

Matton DP, Nass N, Clarke AE, Newbigin E. 1994. Self-incompatibility: How plants avoid illegitimate offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 1992-1997.

Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW. 1993. Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of Arabidopsis. *The Plant Cell* **5**: 1661-1668.

Merrow AW, Wisser RJ, Brown JS, Kuhn DN, Schnell RJ, Broschat TK. 2002. Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 715-726.

Minoo D, Jayakumar VN, Veena SS, Vimala J, Basha A, Saji V, Nirmal Babu K, Peter KV. 2007. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution* **DOI 10.1007/s10722-007-9252-3**.

Minoo D, Nirmal Babu K, Peter KV. 2006a. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. *Scientia Horticulturae* **110**: 175-180.

Minoo D, Nirmal Babu K, Ravindran PN, Peter KV. 2006b. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae* **108**: 414-422.

Murray BG. 2005. When does Intraspecific C-value Variation become Taxonomically Significant? *Annals of Botany* **95**: 119–125.

Nair RR, Ravindran PN. 1994. Somatic association of chromosomes and other mitotic abnormalities in *Vanilla planifolia* (Andrews). *Caryologia* **47**: 65-73.

Nielsen RL. 2000. Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W.Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**: 285-302.

Nielsen RL, Siegismund HR. 1999. Interspecific differentiation and hybridization in *Vanilla* species (Orchidaceae). *Heredity* **83**: 560-567.

Noirot M, Barre P, Duperray C, Hamon S, De Kochko A. 2005. Investigation on the causes of stoichiometric error in genome size estimation using heat experiments: consequences on data interpretation. *Annals of Botany* **95**: 111-118.

Noirot M, Barre P, Duperray C, Louarn J, Hamon S. 2003a. Effects of caffeine and chlorogenic acid on Propidium Iodide accessibility to DNA. Consequences on genome size evaluation in coffee tree. *Annals of Botany* **92**: 259-264.

Noirot M, Barre P, Louarn J, Duperray C, Hamon S. 2000. Nucleus-cytosol interactions - a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Annals of Botany* **86**: 309-316.

Noirot M, Barre P, Louarn J, Duperray C, Hamon S. 2002. Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and Propidium Iodide. *Annals of Botany* **89**: 385-389.

Noirot M, Poncet V, Barre P, Hamon P, Hamon S, De Kochko A. 2003b. Genome size variations in diploid african *Coffea* species. *Annals of Botany* **92**: 709-714.

Noyer J-L, Causse S, Tomekpe K, Bouet A, Baurens F-C. 2005. A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. *Genetica* **124**: 61-69.

Odoux E. 2005. *Contribution à l'étude de l'hydrolyse de la glucovanilline en vanilline dans la gousse du vanillier (Vanilla planifolia G. Jackson)*. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, Montpellier - France.

Olsen RT, Ranney TG, Viloria Z. 2006a. Reproductive behavior of induced allotetraploid x*Chitalpa* and *in vitro* embryo culture of polyploid progeny. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **131**: 716-724.

Olsen RT, Ranney TG, Werner DJ. 2006b. Fertility and inheritance of variegated and purple foliage across a polyploidy series in *Hypericum androsaemum* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **131**: 725-730.

Ortiz R, Vuylsteke D. 1995. Factors influencing seed set in triploid *Musa* spp. L. and production of euploid hybrids. *Annals of Botany* **75**: 151-155.

Paszkowski J, Whitham SA. 2001. Gene silencing and DNA methylation processes. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 123-129.

Pecinka A, Suchankova P, Lysak MA, Travnicek B, Dolezel J. 2006. Nuclear DNA Content Variation among Central European *Koeleria* Taxa. *Annals of Botany* **98**: 117–122.

Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia VA, James-Kay A. 2001. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science* **161**: 359-367.

Perrier X, Flori A, Bonnot F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC, eds. *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Montpellier: Enfield, Science Publishers, 43-76.

Pesson P, Louveaux J. 1984. *Pollinisation et productions végétales*. Paris: INRA.

Pignal M. 1994. Deux vanilles du Brésil : *Vanilla palmarum* Lindley et *Vanilla bahiana* Hoehne. *L'Orchidophile* **110**: 23-25.

Portères R. 1951. Observations sur le Vanillier de Tahiti. *Bulletin de la Société Botanique de France* **98**: 126-127.

Portères R. 1954. Le genre *Vanilla* et ses espèces. In: Lechevalier P, ed. *Le vanillier et la vanille dans le monde*. Paris, 94-290.

Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* **1**: 215-222.

Price HJ, Johnston JS. 1996. Analysis of plant DNA content by Feulgen Microspectrophotometry and Flow Cytometry. In: Jauhar PP, ed. *Methods of analysis in plants*. CRC Press, 115-131.

Przywara L, Pandey KK, Sanders PM. 1988. Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. *New Zealand Journal of Botany* **26**: 179-182.

R Development Core Team. 2006. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-900007-900050, URL http://www.R-project.org.

Ravindran PN. 1979. Nuclear behaviour in the sterile pollen of *Vanilla planifolia* (Andrews). *Cytologia* **44**: 391-396.

Reyna-López GE, Simpson J, Ruiz-Herrera J. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics* **253**: 703-710.

Rhoades MM. 1930. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays* [J]. *Science* **73**: 340-341.

Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JAK, Pieretti I, Flament MH, Lanaud C. 2000. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 948-955.

Romero C, Pedryc A, Muñoz V, Llácer G, Badenes ML. 2003. Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome* **46**: 244-252.

Ronemus MJ, Galbiati M, Ticknor C, Chen J, Dellaporta SL. 1996. Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* **273**: 654-657.

Rutger JN, Jensen NF. 1967. On the use of genetic male sterility in screening for cytoplasmic-genetic sterility in barley. *Euphytica* **16**: 350–353.

Salmon A. 2007. *Contrôle épigénétique du caractère aberrant chez Brassica oleracea L.* Thèse de Doctorat, Agrocampus, Rennes.

Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF. 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* **14**: 1163–1175.

Santoni S, Faivre-Rampart P, Prado E, Prat D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahier d'études et de recherches francophones / Agricultures* **9**: 311-327.

Schaal BA, Olsen KM, Carvalho LJCB. 2006. Evolution, domestication, and agrobiodiversity in the tropical crop cassava. *Darwin's Harvest: New Approaches to the Origins, Evolution and Conservation of Crops*. New York: Columbia University Press, 269-284.

Schlüter PM. 2002. *RAPD variation in Vanilla planifolia Jackson (Orchidaceae) and assessment of the putative hybrid Vanilla tahitensis Moore*. MBiochem Thesis, University of Oxford, Oxford.

Seidler-Lozykowska K. 2003. Determination of the ploidy level in chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Rausch.) strains rich in alpha-bisabolol. *Journal of Applied Genetics* **44**: 151-155.

Shadakshari YG, Madaiah D, Dinesh Kumar M, Shivakumar KV, Bhagavantha Goudra KH. 2003. Pollen viability and stigma receptivity in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Journal of Spices and Aromatic Crops* **12**: 194-196.

Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA. 2001. Sequence Elimination and Cytosine Methylation Are Rapid and Reproducible Responses of the Genome to Wide Hybridization and Allopolyploidy in Wheat. *The Plant Cell* **13**: 1749-1759.

Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES. 1999. The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* **11**: 445-458.

Siljak-Yakovlev S, Solic ME, Catrice O, Brown SC, Papes D. 2005. Nuclear DNA content and chromosome number in some diploid and tetraploid *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae) from the Dalmatia Region. *Plant Biology* **7**: 397-404.

Smith NJH, Williams JT, Plucknett DL, Talbot JP. 1992. *Tropical Forests and Their Crops*. Ithaca: Cornell University Press.

Sokal RR, Michener CD. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* **28**: 1409-1438.

Soliva M, Gautschi B, Salzmann C, Tenzer I, Widmer A. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. *Molecular Ecology* **9**: 2178.

Soto Arenas MA. 1999a. *Conservation of the genetic resources of Vanilla*. PhD dissertation (abstract), UNAM University, Mexico.

Soto Arenas MA. 1999b. *Filogeografia y recursos genéticos de las vainillas de México. Project J101*. 2004 vol. México: CONABIO.

Soto Arenas MA. 2003. Vanilla. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. *Genera orchidacearum: Orchidoideae*. Vol. 3. USA: Oxford University Press, 321-334.

Soto Arenas MA. 2006a. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *Biodiversitas* **66**: 2-9.

Soto Arenas MA. 2006b. Vainilla: los retos de un cultivo basado en una especie amenazada con una historia de vida compleja. In: Consejo Veracruzano de la Vainilla, ed. *Congreso Internacional de Productores de Vainilla*, Papantla, Veracruz, Mexico, 26-28 May 2006.

Spooner DM, Hetterscheid WLA. 2006. Origins, evolution, and group classsification of cultivated potatoes. *Darwin's Harvest: New Approaches to the Origins, Evolution and Conservation of Crops*. New York: Columbia University Press, 285-307.

Stebbins GL. 1950. *Variation and evolution in Plants*. New York: Columbia University Press.

Steffen K. 1963. Male gametophyte. In: Maheswari P, ed. *Recent Advances in the Embryology of Angiosperms*. International Soc. Plant Morphologists, Univ. Delhi, India, 15-40.

Stehlé H. 1952. Le vanillier et sa culture. *Fruits* **7**: 50-56, 99-112, 253-260.

Stern WL, Judd WS. 1999. Comparative vegetative anatomy and systematics of *Vanilla* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **131**: 353-382.

Sybenga J. 1996. Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids : Do segmental allopolyploids exist ? *Genome* **39**: 1176-1184.

Tanaka R, Kamemoto H. 1984. Chromosomes in Orchids: counting and numbers. In: Arditti J, ed. *Orchid biology : reviews and perspectives, III*. Ithaca, New York: Cornell University Press, 323-410.

Tanguy AM, Eber F. 1992. Observation des chromosomes. Techniques de base. Méioses. Introduction. In: INRA, ed. *Techniques de cytogénétique végétale*. Paris: Lavoisier, 36-40.

Tate JA, Soltis DE, Soltis PS. 2005. Polyploidy in Plants. In: Gregory TR, ed. *The Evolution of the Genome*. Elsevier Academic Press, 371-426.

Terasaka O, Niitsu T, Tanaka R. 1979. Single fertilization in *Spiranthes sinensis*. *Journal of Plant Research* **92**: 59-67.

Tilney-Bassett RAE. 1978. Plastids and variegation : Stable pattern genes. In: Kirk JTO, Tilney-Basset RAE, eds. *The plastids: Their chemistry, structure, growth and inheritance*. New York: Elsevier.

Tonier JP. 1951. *Note technique annexée au rapport annuel 1951 du laboratoire d'étude sur le vanillier*. Madagascar.

Verbsky ML, Richards EJ. 2001. Chromatin remodeling in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 494-500.

Vidakovic MB, Vancetovic J, Vidakovic M. 2002. A New Search for Restorer Cytoplasm: The Restorer Cytoplasm for the Gene *ms10* Most Probably Does Not Exist in Maize. *The Journal of Heredity* **93**: 444-447.

Vorsa N, Ballington JR. 1991. Fertility of triploid highbush blueberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**: 336-341.

Vos PR, Hogers M, Bleeker M, Van de Lee Rijans T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.

Waddington CH. 1942. The Epigenotype. *Endeavour* **1**: 18-20.

Weiss EA. 2002. Chapter 7: Orchidaceae. *Spice Crops*. Wallington, UK: CABI publishing, 136-154.

Wendel JF. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* **42**: 225-249.

Wilson JY. 1962. Cytological Investigation of Triploid Sterility. *Nature* **195**: 1329-1330.

Wu C, Morris JR. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* **293**: 1103-1105.

Xiong LZ, Xu CG, Maroof MAS, Zhang Q. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and General Genetics* **261**: 439-446.

Xu M, Li X, Korban SS. 2000. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**: 361-368.

Yang M, Loh CS. 2004. Systemic endopolyploidy in *Spathoglottis plicata* (Orchidaceae) development. *BMC Cell Biology* **5**: 1-8.

Zonneveld BJM, Leitch IJ, Bennett MD. 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 Angiosperms. *Annals of Botany* **96**: 229-244.

ANNEXES

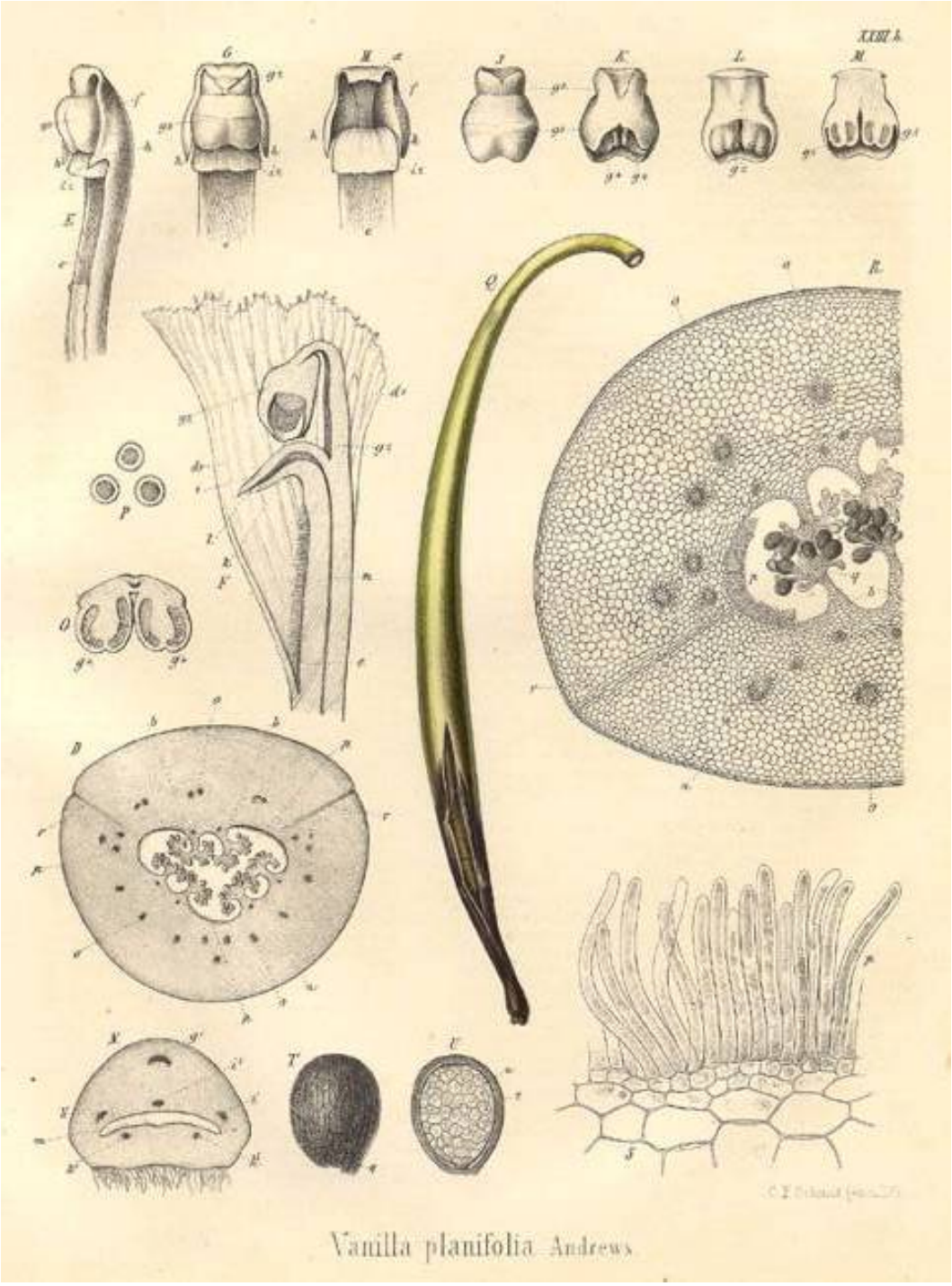
ANNEXES

Annexe 1a

Lithographie de *V. planifolia* (Orchidaceae). Extrait de *Darstellung und Beschreibung sämtlicher in der Pharmacopoea Borusica aufgeführten offizinellen Gewächse* par Otto Carl Berg & Carl Friedrich Schmidt. Leipzig, Arthur Felix, [1858-1863], 1ère édition, volume 3 (planche 23a-b).

Source : http://www.meemelink.com/prints%20pages/prints.Orchidaceae%20R-Z.htm.

Annexe 1b



Annexe 2

Pages suivantes :

Tableau récapitulatif des accessions étudiées au cours de cette thèse et des analyses correspondantes.

Pour le détail des résultats obtenus, se référer au Chapitre 2 pour les analyses AFLP et SSR, au Chapitre 3 pour la cytométrie en flux, la microdensitométrie, les comptages chromosomiques, les mesures de longueur de stomates et les mesures morphologiques, et au Chapitre 4 pour l'analyse MSAP.

[1] BAHIANA, HYBRIDE, ODORATA, POMPONA, TAHITENSIS : position des accessions dans la FIG. 1 de l'article AFLP (analyse interspécifique) ; PLANIF 284 et PLANIF 19 : position des *V. planifolia* dans la FIG. 2 de l'article AFLP.

[2] intra : analyse intraspécifique sur 61 *V. planifolia* et 7 *V. tahitensis* ; transfé. : analyse de transférabilité sur 15 autres espèces.

[3] 25/31 : analyse des 64 accessions avec les marqueurs mVplCIR025 et mVplCIR031 ; 31 : étude phylogéographique sur 137 accessions.

Numéro d'accession	Section / Sous Section (Portères, 1954)	Nom d'espèce intial (à la réception)	Nom d'espèce corrigé	Variété	Provenance	Pays	Chap. 2			Chap. 3					Chap. 4
							Groupes AFLP[1]	Article SSR[2]	Analyses SSR complémentaires[3]	Cytométrie en flux	Microdensitométrie	Comptages chromosomiques	Mesures stomates	Mesures morphologiques	MSAP
PLm0001	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique		Réunion	PLANIF 284	intra		X	X				X
PLm0002	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique		Réunion	PLANIF 284	intra		X					X
HY0003	Fol. Lamellosae	*V. hybride*	*V. hybride*	Manitra Ampotony (PL x TAh)	FOFIFA	Madagascar (Antalaha)	HYBRIDE		25/31	X	X	X			
PL0004	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Costa Rica	PLANIF 284	intra		X					
PL0005	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Amérique Centrale	PLANIF 284	intra							
PL0006	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Amérique Centrale	PLANIF 284	intra		X					
PL0007	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Amérique Centrale	PLANIF 284	intra							
PL0008	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Guatemala	PLANIF 284	intra		X					
PL0009	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Amérique Centrale	PLANIF 284	intra		X					
PL0010	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Costa Rica	PLANIF 284	intra		X			X		
PL0011	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Amérique Centrale	PLANIF 284								
PL0012	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ	Amérique Centrale	PLANIF 284	intra		X					
PL0013	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ		PLANIF 284	intra							
PL0014	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ		PLANIF 284	intra		X					
PL0015	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CATIE/GTZ		PLANIF 284	intra							
PL0016	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		University of Auckland (M. PEARSON)	Samoa	PLANIF 284	intra		X					
TAh0017	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Haapape	SDR Uturoa (F. LE BELLEC)	Polynésie française (Raiatea)	TAHITENSIS	intra	25/31	X		X			
PO0018	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		SDR Uturoa	Polynésie française (Raiatea)	POMPONA			X		X	X	X	
PL0019	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PL0020	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PL0021	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PL0022	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PL0023	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19			X					
PL0024	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19		25/31						
PL0025	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PL0026	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PL0027	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PL0029	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*			Réunion	PLANIF 19								
PO0030	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (M. PLANTE)	Réunion (Ste-Rose) < Comores	POMPONA		25/31	X				X	
PO0031	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (M. PLANTE)	Réunion (Ste-Rose) < Comores	POMPONA			X				X	
PO0033	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (M. PLANTE)	Réunion (Ste-Rose) < Comores	POMPONA								
PL0034	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (M. ROULOF)	Réunion (St-André)	PLANIF 284	intra							
PLv0035	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Variegata	Producteur (A. HOAREAU)	Réunion (St-André)	PLANIF 284	intra							
PL0036	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (A. HOAREAU)	Réunion (St-André)	PLANIF 284	intra							
PL0037	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Biolandes Madagascar	Madagascar (Ambanja)	PLANIF 284			X					
PL0038	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Biolandes Madagascar	Madagascar (Ambanja)	PLANIF 284			X			X		
PL0039	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Biolandes Madagascar	Madagascar (Ambanja)	PLANIF 284								
PL0040	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Biolandes Madagascar	Madagascar (Ambanja)	PLANIF 284								
PL0041	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (F. MAURICE)	Madagascar (Ambanja)	PLANIF 284								
PL0043	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CIRAD	Réunion (St-Pierre)	PLANIF 284								
PL0044	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CIRAD	Réunion (St-Pierre)	PLANIF 284								
PL0045	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CIRAD	Réunion (St-Pierre)	PLANIF 284								
PO0046	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*			Guadeloupe (Petit Bourg)	POMPONA	transfé.	25/31	X			X	X	
PO0047	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*			Guadeloupe (Petit Bourg)	POMPONA			X			X	X	
PO0048	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (E. MIANNEY)	Guadeloupe (Petit Bourg)	POMPONA		25/31	X		X		X	
PL0049	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (E. MIANNEY)	Guadeloupe (Petit Bourg)	PLANIF 284								
PL0050	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (E. MIANNEY)	Guadeloupe (Petit Bourg)	PLANIF 284			X					
PL0051	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CIRAD	Guadeloupe (Neufchâteau)	PLANIF 284	intra		X					
PO0052	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (NELSON)	Guadeloupe (Vieux habitants)	POMPONA			X			X	X	
PO0053	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (E. MIANNEY)	Guadeloupe (Petit Bourg)	POMPONA								
PL0054	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (NELSON)	Guadeloupe (Vieux habitants)	PLANIF 284	intra							
PO0055	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (NELSON)	Guadeloupe (Vieux habitants)	POMPONA								
HY0056	Fol.	*V. hybride*	*V. hybride*	PL x *V. phaeantha*	CIRAD (C. AMAR)	Guadeloupe (Petit Bourg)				X					
PLv0057	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Variegata	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)	PLANIF 284	intra		X					X
AL0058	Fol. Lamellosae	*V. albida*	*V. albida*		Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)		transfé.	31	X					

SP0059	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. albida*	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)			31	X			
SP0060	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. sp.*	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)	HYBRIDE		25/31	X	X	X	
RO0061	Aphyllae	*V. roscheri*	*V. roscheri?*	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)		transfé.					
BA0062	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. bahiana*	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)	BAHIANA		25/31	X			
TA0063	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)	TAHITENSIS	intra	25/31	X			
PO0064	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)	POMPONA		25/31	X		X	
CRE0065	Fol. Lamellosae	*V. crenulata*	*V. crenulata*	Serres d'Auteuil (L. BRAY)	France (Paris)		transfé.	31				
PL0066	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Producteur (J.B. GRONDIN)	Réunion (St-Paul)	PLANIF 284						
CRE0067	Fol. Lamellosae	*V. crenulata*	*V. crenulata*	MNHN (M. PIGNAL)	Centrafrique			31	X			
SP0068	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Costa Rica (Cahuita)	HYBRIDE		25/31	X		X	
SP0069	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Alagoinhas)			31	X			
PO0070	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. pompona*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Catu)	POMPONA		25/31	X	X	X	X
BA0071	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Catu)	BAHIANA	transfé.	25/31				
BA0072	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA		25/31	X	X		
SP0073	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)			31	X			
BA0074	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA						
BA0075	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA		25/31				
BA0076	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA		31	X			
BA0077	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA		25/31				
BA0078	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA						
SP0079	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Guadeloupe			31	X	X		
BA0080	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA						
SP0081	Aphyllae	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31	X	X		
SP0082	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31	X			
PA0083	Fol. Membrannaceae	*V. palmarum*	*V. palmarum*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)		transfé.	31	X	X		
BA0084	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA						
BA0085	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA			X			
BA0086	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA						
SP0087	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31	X	X		
SP0088	Aphyllae	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31				
SP0089	Aphyllae	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31				
PL0090	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. planifolia*	MNHN (M. PIGNAL)	Seychelles	PLANIF 284		31	X			
SP0091	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Afrique			31	X			
PA0093	Fol. Membrannaceae	*V. palmarum*	*V. palmarum*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X			
BA0094	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA						
SP0095	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31				
PO0096	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. pompona*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française (Cayenne)	POMPONA		25/31	X		X	
BA0097	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA			X			
BA0098	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA						
BA0099	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*	MNHN (M. PIGNAL)	Brésil (Bahia)	BAHIANA			X			
SP0100	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31		X		
SP0101	Aphyllae	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31				
SP0102	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Afrique			31	X			
AF0103	Fol. Lamellosae	*V. africana*	*V. africana*	MNHN (M. PIGNAL)	Afrique			31	X			
IM0104	Fol. Papillosae	*V. imperialis*	*V. imperialis*	MNHN (M. PIGNAL)	Afrique			31	X	X		
IM0105	Fol. Papillosae	*V. imperialis*	*V. imperialis*	MNHN (M. PIGNAL)	Afrique		transfé.	31	X	X		
SP0106	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Afrique			31	X			
AF0107	Fol. Lamellosae	*V. africana*	*V. africana*	MNHN (M. PIGNAL)	Afrique			31	X			
HU0108	Aphyllae	*V. humblotii*	*V. humblotii*	MNHN (M. PIGNAL)	Grandes Comores			31	X			
LE0109	Fol. Lamellosae	*V. leprieuri*	*V. leprieuri*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française		transfé.	31	X	X		
SP0110	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31	X	X		
PL0111	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. planifolia*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)	PLANIF 284		25/31	X			
SP0112	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X	X		
SP0113	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Liberia			31	X			
SP0114	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Paraguay			31	X			
SP0115	Fol.	*V. roscheri*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	France (Cherbourg)			31	X			
SP0116	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X			
SP0117	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X	X		
SP0118	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X	X		
SP0119	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*	MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X			

SP0120	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X				
SP0122	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31	X				
HY0123	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. hybride*		Producteur (G. RAMNANDRAIBE)	Madagascar (Antalaha)	HYBRIDE		25/31					
HY0124	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. hybride*		Producteur (G. RAMNANDRAIBE)	Madagascar (Antalaha)	HYBRIDE		25/31					
HY0125	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. hybride*		Producteur (G. RAMNANDRAIBE)	Madagascar (Antalaha)	HYBRIDE		25/31					
PL0126	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. planifolia*		Producteur (G. RAMNANDRAIBE)	Madagascar (Antalaha)	PLANIF 284							
HY0127	Fol.	*V. hybride*	*V. hybride*		Producteur (G. RAMNANDRAIBE)	Madagascar (Antalaha)			31					
TAh0128	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Haapape	Producteur (J. RANJAMANORO)	Madagascar (Antalaha)	TAHITENSIS		25/31					
PL0129	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (J. RANJAMANORO)	Madagascar (Antalaha)	PLANIF 284							
HY0130	Fol. Lamellosae	*V. hybride*	*V. hybride*	Manitra Ampotony (PL x TAh)	Producteur (J. RANJAMANORO)	Madagascar (Antalaha)	HYBRIDE		25/31					
HY0131	Fol. Lamellosae	*V. hybride*	*V. hybride*	Tsy Taitry (PL x PO) X PL	Producteur (J. RANJAMANORO)	Madagascar (Antalaha)	HYBRIDE		25/31					
PL0132	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284			X				
PL0133	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284							
PL0134	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284			X				
PL0135	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284							
PL0136	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284			X				
PL0137	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284							
PL0138	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284							
HY0139	Fol.	*V. pompona*	*V. hybride*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	HYBRIDE		25/31	X			X	
HY0140	Fol. Lamellosae	*V. hybride*	*V. hybride*	(PL x TAh) x PO_{73}	Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	HYBRIDE		25/31					
MA0141	Aphyllae	*V. madagascariensis*	*V. madagascariensis*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)		transfé.	31	X		X		
MA0142	Aphyllae	*V. madagascariensis*	*V. madagascariensis*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)			31	X				
PL0143	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284							
PL0144	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Floribis (E. MARINOT)	Madagascar (Vohemar)	PLANIF 284							
AP0145	Aphyllae	*V. aphylla*	*V. aphylla*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	Thaïlande		transfé.	31	X				
PH0146	Aphyllae	*V. phalaenopsis*	*V. phalaenopsis*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	France (Lyon)		transfé.	31	X		X		
PL0147	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	Martinique	PLANIF 284	intra						
PL0148	Fol. Lamellosae	*V. planifolia?*	*V. planifolia*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	Réunion	PLANIF 284	intra		X			X	
PLv0149	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Variegata	Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	France (Lyon)	PLANIF 284	intra		X				X
PL0150	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	Polynésie française (Tahiti)	PLANIF 284	intra		X				
PL0151	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	France (Lyon)	PLANIF 284							
PO0152	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	France (Lyon)	POMPONA			X		X	X	
SP0153	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	Guyane française			31	X				
AL0154	Fol. Lamellosae	*V. albida*	*V. albida*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	France (Lyon)			31					
SP0155	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	Guyane française			31	X				
IM0156	Fol. Papillosae	*V. imperialis*	*V. imperialis*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	Cameroun			31					
SP0157	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		Parc de la tête d'or (D. SCHERBERICH)	République Dominicaine			31					
PL0158	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		SDR/CIRAD	Polynésie française (Fare)	PLANIF 284	intra						
PL0159	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		SDR/CIRAD	Polynésie française (Fare)	PLANIF 284	intra						
PO0160	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		SDR/CIRAD	Polynésie française (Papeete)	POMPONA		25/31					
HY0161	Fol. Lamellosae	*V. hybride*	*V. hybride*	PL x TA	SDR/CIRAD	Polynésie française (Papeete)			31					
TAr0162	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Rea rea	SDR/CIRAD	Polynésie française (Iles sous le Vent)	TAHITENSIS	intra	25/31					
TAt0163	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Tahiti	SDR/CIRAD	Polynésie française (Iles sous le Vent)	TAHITENSIS	intra	25/31					
TAh0164	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Haapape	SDR/CIRAD	Polynésie française (Iles sous le Vent)	TAHITENSIS	intra	25/31					
TAp0165	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Parahurahu	SDR/CIRAD	Polynésie française (Iles sous le Vent)	TAHITENSIS	intra	25/31					
HY0166	Fol.	*V. sp.*	*V. hybride*		CIRAD (V. ROUSSEL)	France (Montpellier) < Réunion	HYBRIDE		25/31	X				
PO0167	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Exofleur	France (Cornebarieu)	POMPONA		25/31					
PLv0168	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Variegata	Exofleur	France (Cornebarieu)		intra						
PO0169	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. pompona*		Jardin des Plantes (E. SPICQ)	France (Montpellier) < Réunion	POMPONA							
PO0170	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. pompona*		Jardin des Plantes (E. SPICQ)	France (Montpellier)	POMPONA		25/31					
SP0171	Fol.	*V. phalaenopsis*	*V. sp.*		Jardin des Plantes (E. SPICQ)	France (Montpellier)			31					
SP0172	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		Jardin des Plantes (E. SPICQ)	France (Montpellier)			31					
HY0173	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. hybride*		Jardin des Plantes (E. SPICQ)	France (Montpellier)	HYBRIDE		25/31					
EN0174	Fol. Lamellosae	*V. ensifolia*	*V. ensifolia*		Jardin des Plantes (C. FIGUREAU)	Guyane		transfé.	31					
SP0175	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		Jardin des Plantes (C. FIGUREAU)	Cameroun			31					
PL0176	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Jardin des Plantes (C. FIGUREAU)	France (Nantes) < Réunion	PLANIF 284	intra						
SP0178	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		Jardin des Plantes (C. FIGUREAU)	France (Nantes)			31					
HU0179	Aphyllae	*V. humblotii*	*V. humblotii*		FFAO (P. MARTIN)	Mayotte			31					
PL0180	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. planifolia*		FFAO (P. MARTIN)	France	PLANIF 284	intra						

TAh0181	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Haapape	Office Vanille de Tahiti (S. ANDRZEJEWSKI)	Polynésie française (Uturoa)	TAHITENSIS		25/31		
TAt0182	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Tahiti	Office Vanille de Tahiti (S. ANDRZEJEWSKI)	Polynésie française (Uturoa)	TAHITENSIS		25/31		
TAp0183	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*	Parahurahu	Office Vanille de Tahiti (S. ANDRZEJEWSKI)	Polynésie française (Uturoa)	TAHITENSIS		25/31		
TA0184	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. tahitensis*		Raw Energy (A. YOUSSEF)	Papouasie Nouvelle-Guinée	TAHITENSIS		25/31		
PLmg0185	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Magic	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			X
PLst0186	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Stérile	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)		intra			
PLc0188	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0190	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0193	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0196	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0199	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0202	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0206	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0208	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0211	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0213	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0217	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				X
PLc0218	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0219	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0222	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0223	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0226	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0229	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0232	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0235	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0239	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0241	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0244	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0249	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0250	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0253	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0255	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0261	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0262	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0265	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0268	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0271	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0276	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0277	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0281	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0283	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0286	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0289	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0292	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0295	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0298	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0302	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0305	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0307	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0310	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0313	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0316	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0319	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0322	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0325	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0328	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0331	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284		25/31		
PLm0334	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra	25/31		X
PLm0335	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLm0336	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X

PLm0337	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			X
PLm0338	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLm0339	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0340	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Facies Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			X
PLc0341	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Facies Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0342	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Facies Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0343	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			X
PLc0344	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0345	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0346	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0349	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0352	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0355	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0358	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0361	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0364	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0367	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0370	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0373	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0376	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0379	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0382	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0385	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0388	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0391	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0394	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0397	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0400	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0403	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0406	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0409	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0412	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284		25/31		
PLc0415	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0418	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0421	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0424	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0427	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0430	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0433	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0436	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0439	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0442	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0445	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0448	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0451	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0454	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0457	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				X
PLc0458	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0459	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)					X
PLc0460	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0463	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0466	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0469	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0472	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			
PLc0475	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0478	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0481	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0484	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0487	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284				
PLc0490	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra			

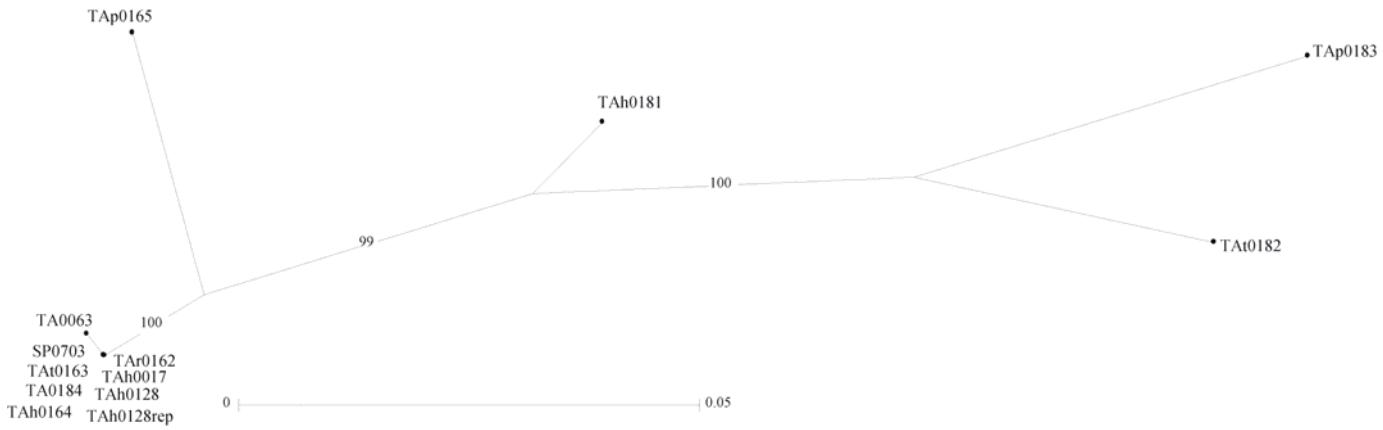
PLm0493	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Facies Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							X
PLm0494	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Facies Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)								X
PLm0495	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Facies moins Mexique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)								X
PLc0496	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra						
PLc0499	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0502	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0505	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0508	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0511	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra						
PLc0514	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0517	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0520	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0523	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0526	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0529	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0532	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0535	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0538	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra						
PLc0542	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra						
PLc0544	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra						
PLc0547	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0550	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0552	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0555	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0558	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0561	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0563	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra						X
PLc0564	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)								X
PLc0565	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)								X
PLc0566	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0569	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0572	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0574	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0577	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284	intra	31					
PLc0580	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0583	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0586	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0589	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0592	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0595	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0599	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0601	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0604	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)		intra						
PLc0605	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0607	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0610	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0613	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLc0616	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							
PLmg0619	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Magic	Provanille (B. COME)	Réunion (Bras-Panon)	PLANIF 284							X
PO0620	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (L. EDMOND)	Réunion (Ste-Rose) < Comores	POMPONA			X		X	X	X	
PO0621	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (L. EDMOND)	Réunion (Ste-Rose) < Comores	POMPONA		25/31						
PL0622	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (J.J. LUSINIER)	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284								
PL0623	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (J.J. LUSINIER)	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284		25/31						
PL0624	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (J.J. LUSINIER)	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284			X					
PL0625	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (J.J. LUSINIER)	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284								
PL0626	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (J.J. LUSINIER)	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284								
PLm0627	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X					X
PLa0628	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Aiguille	Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 19		25/31	X		X	X		
PLa0629	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Aiguille	Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 19			X					
PLst0630	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Stérile	Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X		X	X		X

PLc0631	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X					
PLm0632	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 19		25/31	X					X
PO0633	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	POMPONA			X		X	X		
PLc0638	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (M. ROULOF)	Réunion (St-André)	PLANIF 284			X					
PO0639	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (M. ROULOF)	Réunion (St-André)	POMPONA		25/31	X		X			
PL0640	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (M. PADRE)	Réunion (St-André)	PLANIF 284								
PLgv0641	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Grosse Vanille	Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X		X	X		X
PLc0642	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X		X	X		
PLgv0643	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Grosse Vanille	Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X	X		X		X
PLgv0644	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Grosse Vanille	Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284		25/31	X		X	X		
PLst0645	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Stérile	Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X		X	X		X
PLgv0646	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Grosse Vanille	Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X			X		X
PLc0647	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (R. SAUTRON)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X					X
PL0648	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (R. SAUTRON)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X					X
PLm0649	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mexique	Producteur (R. SAUTRON)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X					X
PLc0650	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (R. SAUTRON)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X					X
PLc0651	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (R. SAUTRON)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284			X	X				
PL0653	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Domaine ONF	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284								
PL0654	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Domaine ONF	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284								
PLc0655	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (P. BOYER)	Réunion (St-André)	PLANIF 284								
PLc0656	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (P. BOYER)	Réunion (St-André)	PLANIF 284			X					
PL0657	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (B. DIJOUX)	Réunion (St-André)	PLANIF 284								
PL0658	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (B. DIJOUX)	Réunion (St-André)	PLANIF 284								
PL0659	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (B. DIJOUX)	Réunion (St-André)	PLANIF 284								
PLc0660	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (K. TECHER / J. MICHEL)	Réunion (St-André)	PLANIF 284			X			X		
PL0661	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (K. TECHER / J. MICHEL)	Réunion (St-André)	PLANIF 284								
PO0662	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Producteur (G.A. POULBASSIA)	Réunion (Ste-Suzanne)	POMPONA		25/31						
PLc0663	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (G.A. POULBASSIA)	Réunion (Ste-Suzanne)	PLANIF 284								
PLc0664	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Producteur (G.A. POULBASSIA)	Réunion (Ste-Suzanne)	PLANIF 284								
SP0665	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		MNHN (M. PIGNAL)	Guyane française			31						
CH0666	Fol. Lamellosae	*V. chamissonis*	*V. chamissonis*		Eco Orquideas (S. GUTFREUND)	Brésil (Sao Paulo)			31	X		X			
CH0667	Fol. Lamellosae	*V. chamissonis*	*V. chamissonis*		Eco Orquideas (S. GUTFREUND)	Brésil (Sao Paulo)			31	X					
BA0668	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*		Producteur (C. FIKENSCHER)	Brésil (Bahia)	BAHIANA		25/31						
PL0669	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (C. FIKENSCHER)	Brésil (Bahia)	PLANIF 284								
PL0670	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (C. FIKENSCHER)	Brésil (Bahia)	PLANIF 284								
BA0671	Fol. Lamellosae	*V. bahiana*	*V. bahiana*		Producteur (C. FIKENSCHER)	Brésil (Bahia)	BAHIANA		25/31						
PL0673	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CPS (V. TUIA)	Samoa	PLANIF 284			X					
PL0674	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CPS (V. TUIA)	Fiji (Suva)	PLANIF 284								
PL0675	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CPS (V. TUIA)	Fiji (Suva)	PLANIF 284								
PL0676	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CPS (V. TUIA)	Fiji (Suva)	PLANIF 284								
PL0678	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		CPS (V. TUIA)	Fiji (Suva)	PLANIF 284								
PO0680	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. pompona*		CIRAD	Guyane (Combi)	POMPONA		25/31	X		X	X	X	
PO0681	Fol. Lamellosae	*V. sp.*	*V. pompona*		CIRAD	Guyane (St-Elie)	POMPONA		25/31	X				X	
SP0682	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		CIRAD	Guyane (St-Elie)			31			X			
SP0683	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		CIRAD	Guyane (Combi)	HYBRIDE		25/31			X			
PL0684	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Domaine ONF	Réunion (Bois Blanc)	PLANIF 284								
PL0685	Fol. Lamellosae	*V. tahitensis*	*V. planifolia*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	France (Paris)	PLANIF 284								
OD0686	Fol. Lamellosae	*V. odorata*	*V. odorata*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	France (Paris)	ODORATA	transfé.	25/31	X					
PL0687	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	France (Paris)	PLANIF 284								
PLv0688	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Variegata	Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	Cote d'Ivoire	PLANIF 284								X
PO0691	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	France (Paris)	POMPONA		25/31	X			X		
GR0693	Fol. Lamellosae	*V. grandiflora*	*V. grandiflora*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	Guyane			31	X					
MA0694	Aphyllae	*V. madagascariensis*	*V. madagascariensis*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	France (Paris)			31						
PL0695	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	Guadeloupe	PLANIF 284								
CRE0696	Fol. Lamellosae	*V. crenulata*	*V. crenulata*		Jardins du Luxembourg (P. BERTAUX)	France (Paris)			31	X		X			
SP0697	Aphyllae	*V. sp.*	*V. sp.*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)			31						
SP0698	Fol.	*V. sp.*	*V. sp.*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)			31						
SP0699	Aphyllae	*V. sp.*	*V. sp.*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)			31						
SP0700	Fol.	*V. aphylla*	*V. sp. (bahiana ?)*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)			31	X		X			
PL0701	Fol. Lamellosae	*V. bicolor*	*V. planifolia*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)	PLANIF 284		25/31	X					

CH0702	Fol. Lamellosae	*V. chamissonis*	*V. chamissonis*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)		transfé.	31	X			
TA0703	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. tahitensis*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)	TAHITENSIS		25/31				
PL0704	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)	PLANIF 284						
SP0705	Fol. Lamellosae	*V. polylepis*	*V. sp.*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)			31	X		X	
SP0706	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. sp.*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)	HYBRIDE		25/31	X			
SP0707	Fol.	*V. wightiana*	*V. sp. (bahiana ?)*		Royal Botanic Gardens (P. MALAXECHEVARRIA)	Royaume-Uni (Kew)			31	X		X	
PO0708	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Jardin Parfums & Epices (P. FONTAINE)	Réunion (St-Philippe)	POMPONA		25/31	X			
PL0709	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)	PLANIF 284						X
PLv0710	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Variegata	Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284						X
PL0711	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284						X
PLc0712	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Classique	Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284						
PL0713	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. planifolia*		Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284			X			
PL0714	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284						X
PL0715	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. planifolia*		Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284						
PLst0716	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Stérile	Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284						X
PL0717	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Association "Les Béliers"	Réunion (Ste-Rose)	PLANIF 284						
HY0747	Fol. Lamellosae	*V. hybride*	*V. hybride*	semis de Tsy Taitry autofécondée	CIRAD / RANJAMANORO	Réunion/Madagascar	PLANIF 19		25/31	X			
HY0751	Fol. Lamellosae	*V. hybride*	*V. hybride*	semis de Tsy Taitry autofécondée	CIRAD / RANJAMANORO	Réunion/Madagascar	PLANIF 19		25/31				
PL0762	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		AREU (S.P.B. MADHU)	Maurice	PLANIF 284						X
PL0763	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		District Agricultural Farm Koothal	Inde (Kerala)	PLANIF 284						
PL0764	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		District Agricultural Farm Koothal	Inde (Kerala)	PLANIF 284						
PL0765	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur (F. GALLAY)	Martinique (Vauclin)	PLANIF 284						
PLma0766	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLvn0767	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Vainilla	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLme0768	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mestiza	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0769	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLac0770	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Acamaya	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0771	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0772	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0773	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0774	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284		25/31				
PLma0775	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0776	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0777	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0778	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0779	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0780	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0781	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLco0782	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Colibri	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLco0783	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Colibri	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 19		25/31				
PLco0784	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Colibri	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 19						
PLob0785	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Oreja de burro	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 19						
PLob0786	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Oreja de burro	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 19						
PLma0787	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0788	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0789	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PLma0790	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Mansa	Univ. Riverside (P. LUBINSKY)	Mexique	PLANIF 284						
PL0791	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Producteur	Réunion (Ste-Suzanne)	PLANIF 284						
AL0793	Fol. Lamellosae	*V. albida*	*V. albida*		Jardin Botanique CBG (J.G. CHRISTENSEN)	Thaïlande				X			
PO0795	Fol. Lamellosae	*V. pompona*	*V. pompona*		Jardin Botanique CBG (J.G. CHRISTENSEN)	Guadeloupe				X			
IM0796	Fol. Papillosae	*V. imperialis*	*V. imperialis*		Jardin Botanique CBG (J.G. CHRISTENSEN)	Danemark (Copenhague)			31	X			
IM0797	Fol. Papillosae	*V. imperialis*	*V. imperialis*		Jardin Botanique CBG (J.G. CHRISTENSEN)	Danemark (Copenhague)			31	X			
PL0798	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Station agriculture (V. LEBOT)	Vanuatu (Port Vila)	PLANIF 284						
PL0800	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*		Station agriculture (V. LEBOT)	Vanuatu (Port Vila)	PLANIF 284			X			
PLgv0802	Fol. Lamellosae	*V. planifolia*	*V. planifolia*	Grosse Vanille	Producteur (P. AH-NIEME)	Réunion (St-Philippe)				X			

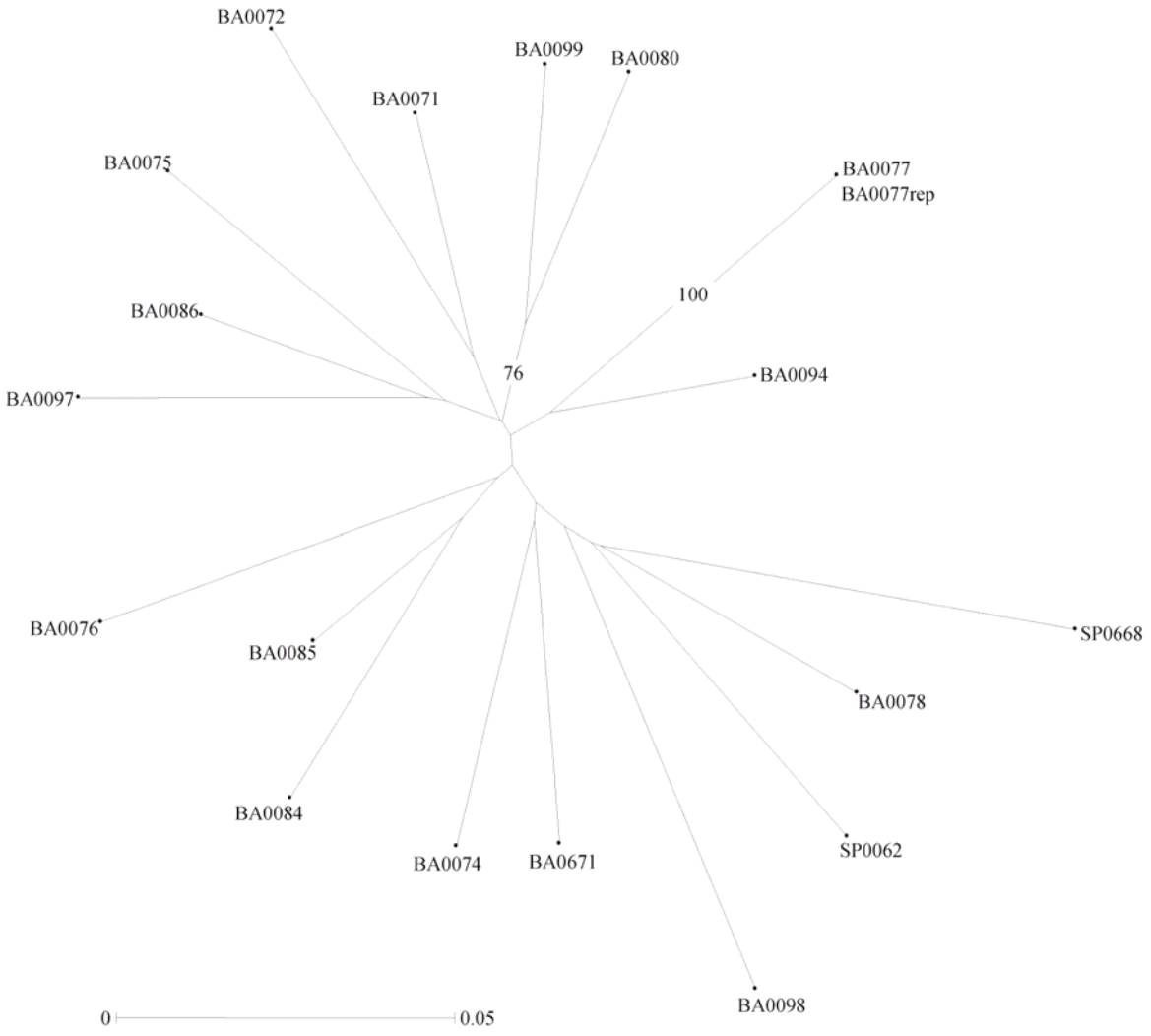
Annexe 3

Dendrogramme présentant la structuration de la diversité de 12 accessions de *V. tahitensis* construit par la méthode du Neighbor-Joining utilisant la distance de Sokal et Michener (1958) sur les résultats de l'analyse AFLP (347 marqueurs amplifiés dont 62 polymorphes). 1000 bootstraps ont été calculés, seules les valeurs supérieures à 60% sont indiquées.



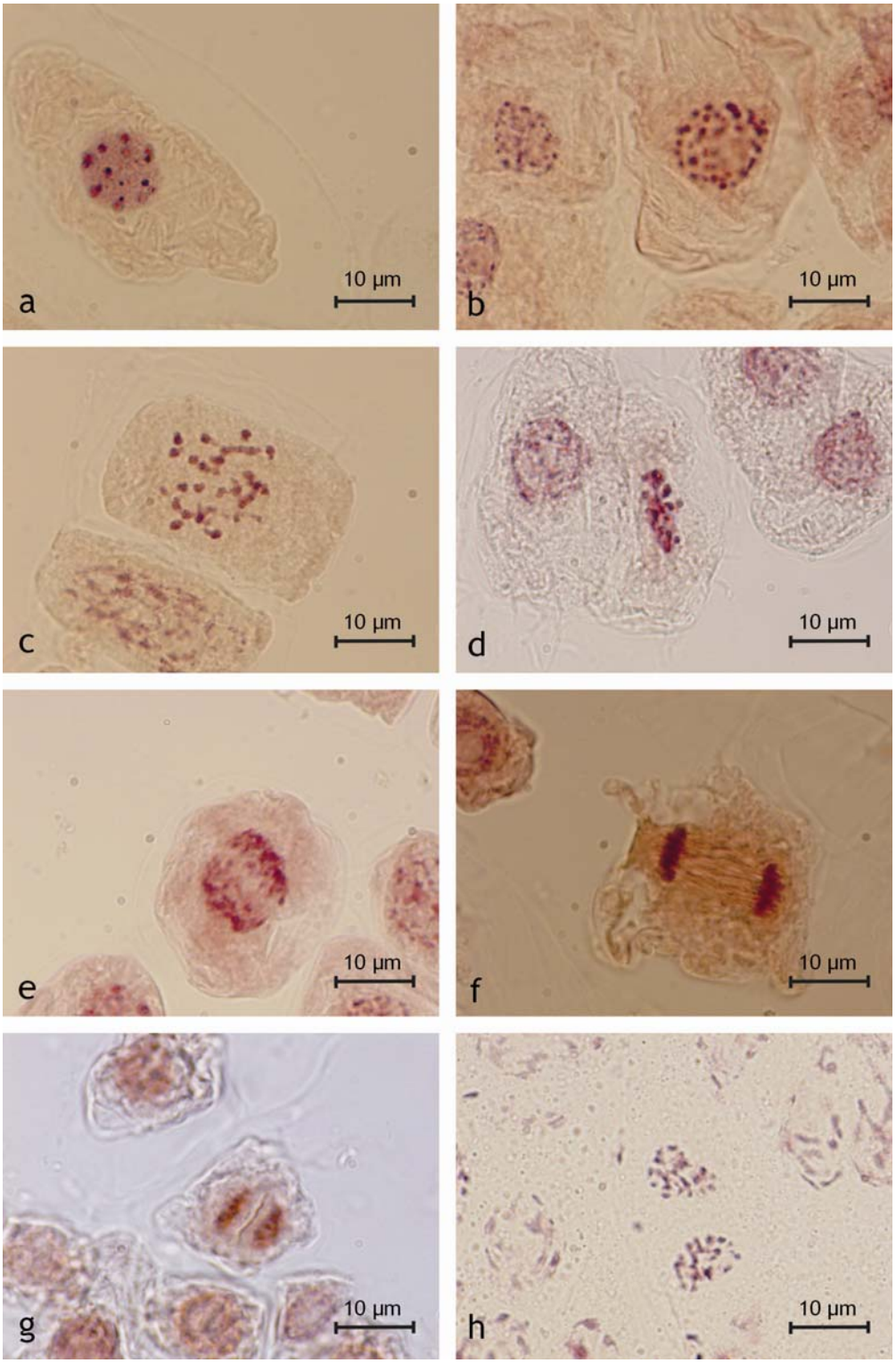
Annexe 4

Dendrogramme présentant la structuration de la diversité de 18 accessions de *V. bahiana* construit par la méthode du Neighbor-Joining utilisant la distance de Sokal et Michener (1958) sur les résultats de l'analyse AFLP (402 marqueurs amplifiés dont 169 polymorphes). 1000 bootstraps ont été calculés, seules les valeurs supérieures à 60% sont indiquées.



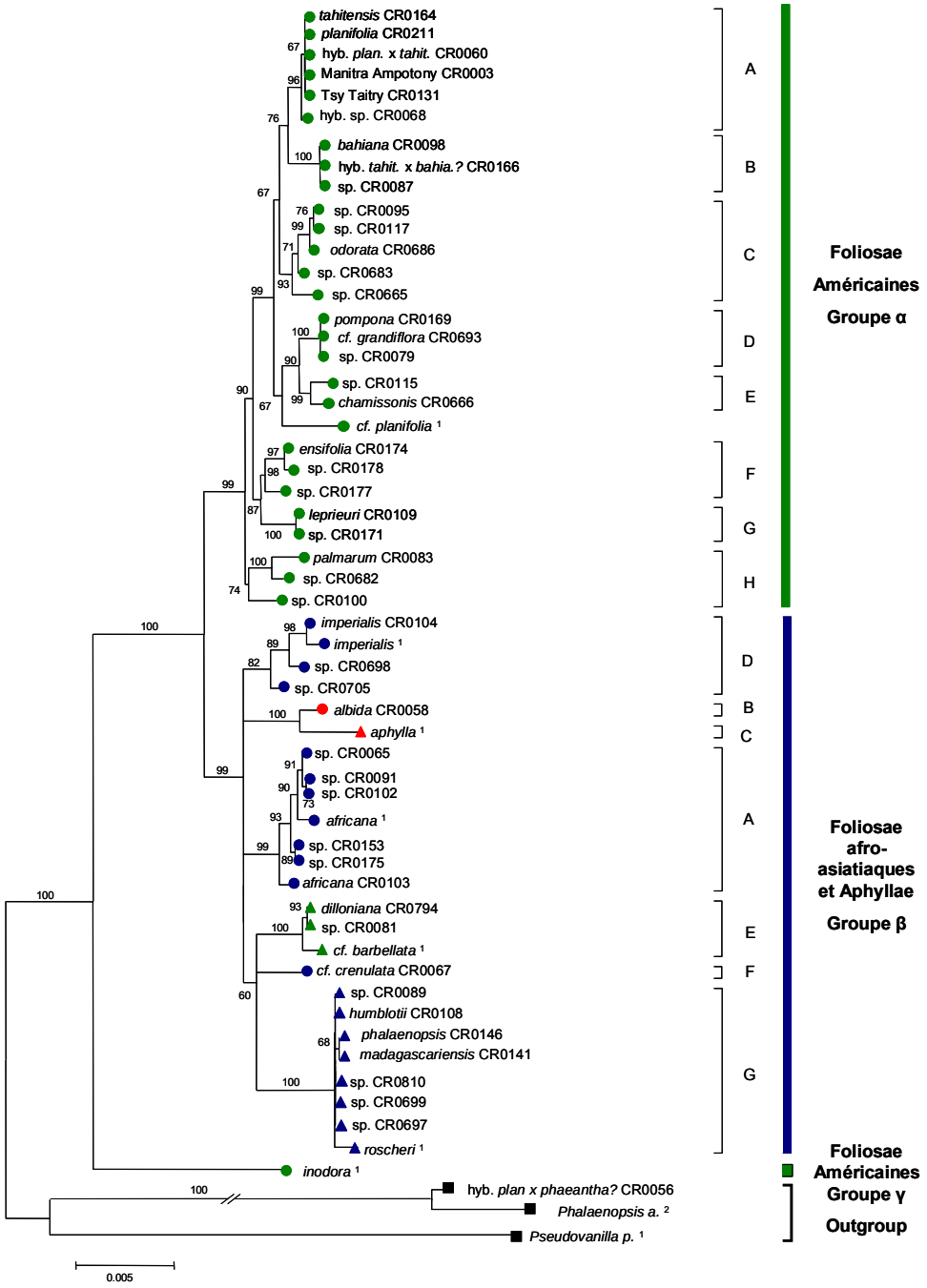
Annexe 5

Photographies des différentes phases de la mitose de cellules de racines aériennes de vanille colorées à l'acéto-orcéine : (a) SP0060 interphase, (b) PO0070 prophase, (c) SP0060 pro-métaphase, (d) PL0642 métaphase, (e) PO0620 anaphase début, (f) PO0633 anaphase fin, (g) PL0630 télophase début, (h) PO0018 télophase fin.



Annexe 6

Représentation simplifiée du phylogramme obtenu par la méthode de Neighbor-Joining à partir de la séquence des gènes *psa*B, *psb*B, *psb*C et *rbc*L concaténés. Les sous-groupes d'espèces de *Vanilla* sont identifiés par une lettre. Les sections Foliosae (●) et Aphyllae (▲) sont précisées, ainsi que l'origine géographique (Amérique en vert, Afrique en bleu et Asie en rouge). Les valeurs des bootstraps supérieures à 60% sont indiquées à proximité des branches. [1] Cameron *et al.* (1999, 2004) ; Cameron and Molina (2006), [2] Chang *et al.* (2006). D'après Bouetard (2007).



[1] **Cameron KM. 2004**. Utility of plastid *psa*B gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1157-1180 ; **Cameron KM, Chase MW, Whitten WM, Kores PJ, Jarrell DC, Albert VA, Yukawa T, Hills HG, Goldman DH. 1999**. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbc*L nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208-224 ; **Cameron KM, Molina MC. 2006**. Photosystem II gene sequences of *psb*B and *psb*C clarify the phylogenetic position of *Vanilla* (Vanilloideae, Orchidaceae). *Cladistics* 22: 239-248.

[2] **Chang C-C, Lin H-C, Lin I-P, Chow T-Y, Chen H-H, Chen W-H, Cheng C-H, Lin C-Y, Liu S-M, Chang C-C, Chaw S-M. 2006**. The Chloroplast Genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): Comparative Analysis of Evolutionary Rate with that of Grasses and Its Phylogenetic Implications. *Molecular Biology and Evolution* 23: 279-291.

Diversity of *Vanilla planifolia* in the Indian Ocean and its related species: genetics, cytogenetics and epigenetics aspects

The cultivated species *Vanilla planifolia* G. Jackson is a typical example of a vegetatively propagated crop introduced from its area of origin (America) to new regions where natural pollinators are absent. In these conditions how can be explained the phenotypic variations observed among *Vanilla* cultivars in introduction areas such as Reunion Island (Indian Ocean)? These could be the result of different introduction events, somatic mutations, sexual reproduction (through manual pollination), polyploidy or epigenetics phenomena.

AFLP markers were used to elucidate the patterns of introduction of *V. planifolia* and showed that most of the accessions cultivated today in the islands of the Indian Ocean derive from a single introduced genotype. Except for one particular phenotype 'Aiguille' found in Reunion Island, which results from sexual reproduction, cultivated accessions exhibit very low levels of genetic diversity and have evolved by the accumulation of point mutations through vegetative multiplication. A similar pattern of diversification was revealed for *V. tahitensis* J.W. Moore, a species cultivated in Polynesia, which was suggested to derive from *V. planifolia*. The comparative analysis of the levels of diversity in related spontaneous American species revealed low for *V. bahiana* Hoehne to high levels for *V. pompona* Schiede, correlated with the extent of their area of natural dispersion and confirmed a combined vegetative/sexual reproduction for these species. These results were confirmed by the microsatellite markers developed from *V. planifolia.* These markers, transferable and polymorphic across some other wild American, African and Asian species, revealed consistent relationships between species, together with a strong pattern of *Old World* vs *New World* differentiation in the genus. These microsatellites will be very useful for diversity, hybridization and phylogeographic studies in the genus *Vanilla*.

Flow cytometry, microdensitometry, chromosome counts and stomatal length showed that polyploidization is actively involved in the diversification of *V. planifolia* in Reunion Island. Three ploidy levels (2x, 3x, 4x) were revealed that allowed to explain the features of the 'Stérile' type which is auto-triploid and of the 'Grosse Vanille' type, auto-tetraploid. *V. pompona* could be an ancient tetraploid which might have evolved through chromosome fusions as well as genome downsizing. The strong variation in nuclear DNA content and high frequency of aneuploidy in all other *Vanilla* species studied, obviously showed that polyploidization is a major and recurrent phenomenon in the evolution of *Vanilla* genus.

DNA methylation was revealed in *V. planifolia*, however no methylation polymorphism was found which could explain the phenotypic variability of the types 'Variegata' and 'Mexique'. Their origin therefore remains to be elucidated.

As many tropical species introduced for cultivation, vanilla displays a narrow genetic basis which makes it vulnerable to diseases. For a plant of economic importance such as vanilla, the increase of the genetic variability and the search for new agronomic and organoleptic potentialities are major targets for research. Vanilla is a model of choice to study domestication consequences through vegetative propagation as well as to elucidate evolutionary history of the largest plant family: orchidaceae.

Keywords: AFLP, aneuploidy, diversification, hybridization, Reunion Island, MSAP, Orchidaceae, polyploidy, genetic resources, SSR, genome size, *Vanilla*

Diversité de *Vanilla planifolia* dans l'Océan Indien et de ses espèces apparentées : aspects génétiques, cytogénétiques et épigénétiques

L'espèce cultivée *Vanilla planifolia* G. Jackson est un exemple typique de plante cultivée à reproduction végétative introduite depuis son aire d'origine (l'Amérique) vers de nouvelles régions où ses pollinisateurs naturels sont absents. Dans ces conditions, comment peuvent être expliquées les variations phénotypiques observées parmi les cultivars de *Vanilla* dans les zones d'introduction telles que l'île de La Réunion (Océan Indien) ? Elles peuvent être le résultat de différents évènements d'introduction, de mutations somatiques, de la reproduction sexuée (à travers la pollinisation manuelle), de la polyploïdie ou de phénomènes épigénétiques.

Les marqueurs AFLP ont été utilisés pour élucider les schémas d'introduction de *V. planifolia* et ils montrent que la plupart des accessions cultivées de nos jours dans les îles de l'Océan Indien dérivent d'un seul génotype introduit. A l'exception d'un phénotype particulier, 'Aiguille' découvert à La Réunion et issu de reproduction sexuée, les accessions cultivées présentent de très faibles niveaux de diversité génétique et ont évolué grâce à l'accumulation de mutations ponctuelles à travers la multiplication végétative. Un schéma de diversification similaire a été révélé pour *V. tahitensis* J.W. Moore, espèce cultivée en Polynésie dérivant vraisemblablement de *V. planifolia*. L'analyse comparative des niveaux de diversité chez des espèces spontanées américaines génétiquement proches a révélé des niveaux faible pour *V. bahiana* Hoehne et élevé pour *V. pompona* Schiede, corrélés avec l'étendue de leur aire naturelle de dispersion et a confirmé l'existence d'un régime mixte de reproduction chez ses espèces (sexuée et végétative). Ces résultats sont confirmés par les marqueurs microsatellites développés chez *V. planifolia.* Les marqueurs transférables et polymorphes aux espèces sauvages américaines, africaines et asiatiques ont révélé une différenciation robuste des espèces, ainsi qu'une forte dichotomie du genre entre *Ancien Monde* et *Nouveau Monde*. Ces microsatellites seront très utiles pour les études de diversité, d'hybridation et de phylogéographie dans le genre *Vanilla*.

La cytométrie en flux, la microdensitométrie, les comptages chromosomiques et les longueurs de stomates ont montré que la polyploïdisation a joué un rôle important dans la diversification de *V. planifolia* à la Réunion. Trois niveaux de ploïdie (2x, 3x, 4x) ont été révélés permettant d'expliquer les particularités des phénotypes réunionnais 'Stérile' auto-triploïde et 'Grosse Vanille' auto-tétraploïde. *V. pompona* possède les caractéristiques d'un ancien tétraploïde ayant évolué soit par fusions de chromosomes soit par contraction génomique. La forte variation de la quantité d'ADN nucléaire et la fréquence élevée de l'aneuploïdie chez toutes les espèces de *Vanilla* étudiées, montrent de toute évidence que la polyploïdisation est un phénomène majeur et récurrent dans l'évolution du genre.

Il existe de la méthylation dans le génome de *V. planifolia* mais aucun polymorphisme de méthylation n'a permis d'expliquer les particularités des phénotypes 'Variegata' et 'Mexique'. L'origine de ces particularités doit être recherchée par ailleurs.

Comme beaucoup d'autres espèces tropicales introduites pour leur culture, le vanillier possède donc une base génétique très restreinte qui le rend vulnérable aux maladies. Chez une plante d'importance économique comme le vanillier, l'accroissement de la variabilité génétique et l'apport de nouvelles potentialités agronomiques et organoleptiques sont donc des enjeux majeurs pour la recherche. Le vanillier est d'autre part un modèle de choix pour étudier les conséquences de la domestication (à travers la reproduction végétative) mais également pour élucider l'histoire évolutive de la plus grande famille de plantes : les orchidées.

Mots clés : AFLP, aneuploïdie, diversification, hybridation, La Réunion, MSAP, Orchidaceae, polyploïdie, ressources génétiques, SSR, taille de génome, *Vanilla*