Rapport de Stage

Master 2 - Biodiversité et EcoSystèmes Tropicaux

Diversité génétique de *Vanilla mexicana* Mill. (Orchidaceae) en Guadeloupe

Réalisé par Narindra RAKOTOMANGA

Encadrement scientifique : Pascale BESSE, Rodolphe GIGANT

Organisme d'accueil : 3P CIRAD St-Pierre – UMR PVBMT

Faculté des Sciences et Technologies

Université de La Réunion

Année Universitaire : 2014-2015

Photo de couverture : http://vireusegate.canalblog.com/archives/2013/10/23/28277937.html

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes maîtres de stage, Pascale et Rodolphe qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ce stage et m'ont donné la chance de travailler avec eux encore une autre année. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et de la biomol (qui n'est pas de tout repos !!). Merci d'avoir partagé avec moi vos connaissances et de m'avoir consacré votre temps. Je vous remercie également pour l'autonomie, la confiance que vous m'avez accordée tout au long du stage et la grande compréhension que vous avez eue à mon égard (je n'aurais pas pu tomber sur meilleurs maîtres de stage que vous).

Merci au Parc National de la Guadeloupe et à l'Association Guadeloupéenne d'Orchidophilie pour m'avoir confié leur « Vanille ». L'équipe « Vanille » m'a ouvert à beaucoup de possibilités… (une malgache à la Réunion étudiant des vanilles de la Guadeloupe !!). Merci infiniment.

Merci au 3P de m'avoir accueilli et de m'avoir ouvert les portes des labos.

Un grand merci à Cédric, Joëlle, Maeva, Morguen, Tristan pour les moments de détente qui m'ont permis de m'évader à chaque fois que j'en avais besoin.

Je n'oublie pas bien sûr la bande du kiosque avec qui j'ai partagé des rires à en avoir mal au ventre pendant le déjeuner, merci beaucoup.

Merci à ma famille et à Suzis, même loin de moi vous êtes d'un soutien sans faille et d'une confiance incroyable. Pour finir, tout simplement… merci à ma maman.

SOMMAIRE

Introduction 1
I. Présentation de l'espèce *Vanilla mexicana* Mill. 2
II. Processus déterminant la diversité d'une population et sa structuration 4
II.2. Modes de reproduction 4
II.2. Flux de gènes 6
III. Conséquences de la dérive génétique, du goulot d'étranglement et de la consanguinité sur la diversité génétique 9
IV. Problématique, objectifs de l'étude et méthodologies envisagées 10
Matériel et méthodes 11
I. Echantillonnage 11
II. Evaluation du taux de fructification naturelle 11
III. Analyse génétique et marqueurs utilisés 11
III.1. Extraction d'ADN 11
III.2. Purification des ADN 12
III.3. Mise au point de marqueurs microsatellites 12
III.4. Amplification des fragments d'ADN microsatellites 12
III.5. Génotypage 13
IV. Analyses statistiques de génétique 13
IV.1. Diversité génétique 13
IV.2. Différenciation génétique 14
IV.3. Structuration des populations 15
Résultats 16
I. Biologie de la reproduction de *V. mexicana* 16
II. Analyse de la diversité génétique 16
II.1 Informativité des loci 16
II.2. Diversité génétique à l'échelle de la Guadeloupe 17
II.3. Différenciation génétique 17
II.4. Structuration des populations 18
Discussion 19
I. Régime de reproduction de *V. mexicana* 19
II. Marqueurs microsatellites 21
III. Faible taux d'hétérozygotie en Guadeloupe 22
IV. Différenciation et structuration génétiques des populations de *V. mexicana* en Guadeloupe 22
V. Stratégies de conservation de *V. mexicana* 23
Conclusion et perspectives 25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 26

INTRODUCTION

La notion de biodiversité est un concept utilisé parmi les biologistes, les écologistes, les dirigeants politiques et les citoyens. En 1992, la convention de Rio définit la biodiversité comme étant la variabilité des organismes vivants de toute origine, y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques, et les complexes écologiques qui en font partie. Il est nécessaire de maintenir cette biodiversité car elle représente une valeur économique comme bio ressources (Frankham, 1995), en offrant ses services non seulement à l'Homme en tant qu'entité biologique (services écosystémiques) mais aussi à l'Homme culturel, tant la nature peut avoir une valeur esthétique voire cultuelle. Cependant, la diversité biologique de la planète a été rapidement appauvrie par les conséquences directe ou indirecte des activités de l'Homme (Frankham, 1995) et de nombreuses espèces sont déjà éteintes et plusieurs autres ont la taille de leur population réduite à tel point qu'elles sont en voie d'extinction (Frankham, 1995). De nombreux facteurs sont responsables de l'érosion de la biodiversité tels que la perte des habitats naturels, l'introduction d'espèces exotiques, la surexploitation des ressources forestières et la pollution (Frankham, 1995).

Les forêts tropicales recèlent la plus large diversité spécifique connue car elles contiennent plus de la moitié des espèces animales et végétales de la planète (Puig, 2001). Les orchidées, bien qu'elles soient très diverses en forêt tropicale, voient leurs populations clairsemées, hautement vulnérables à l'extinction (Sastre et Jouy, 2001). Les changements environnementaux, les dégâts causés par les catastrophes naturelles ainsi que les facteurs génétiques tendent à réduire la taille des populations (Frankham, 1995) et à affecter leur diversité génétique (Frankham, 2005). Les petites populations sont ainsi sensibles à l'extinction car elles perdent leur capacité d'adaptation aux changements environnementaux (Frankham, 2005). Ces changements d'ordre écologique tendent également à perturber les cycles biologiques des populations et peuvent entrainer des modifications profondes de la structure génétique de ces populations. Il est alors nécessaire de connaître les différents paramètres qui influencent la diversité d'une population. Ce rapport bibliographique propose un aperçu des processus impliqués dans la structure génétique des populations, avec un regard particulier sur la littérature concernant les espèces de vanilliers, en tant qu'objet d'étude du stage.

Le sujet de ce stage s'inscrit dans le cadre du projet VaBiome. Il s'agit d'un programme de coopération et de recherche financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) qui concerne l'étude de la diversité biologique des vanilliers de certaines régions ultrapériphériques européennes.

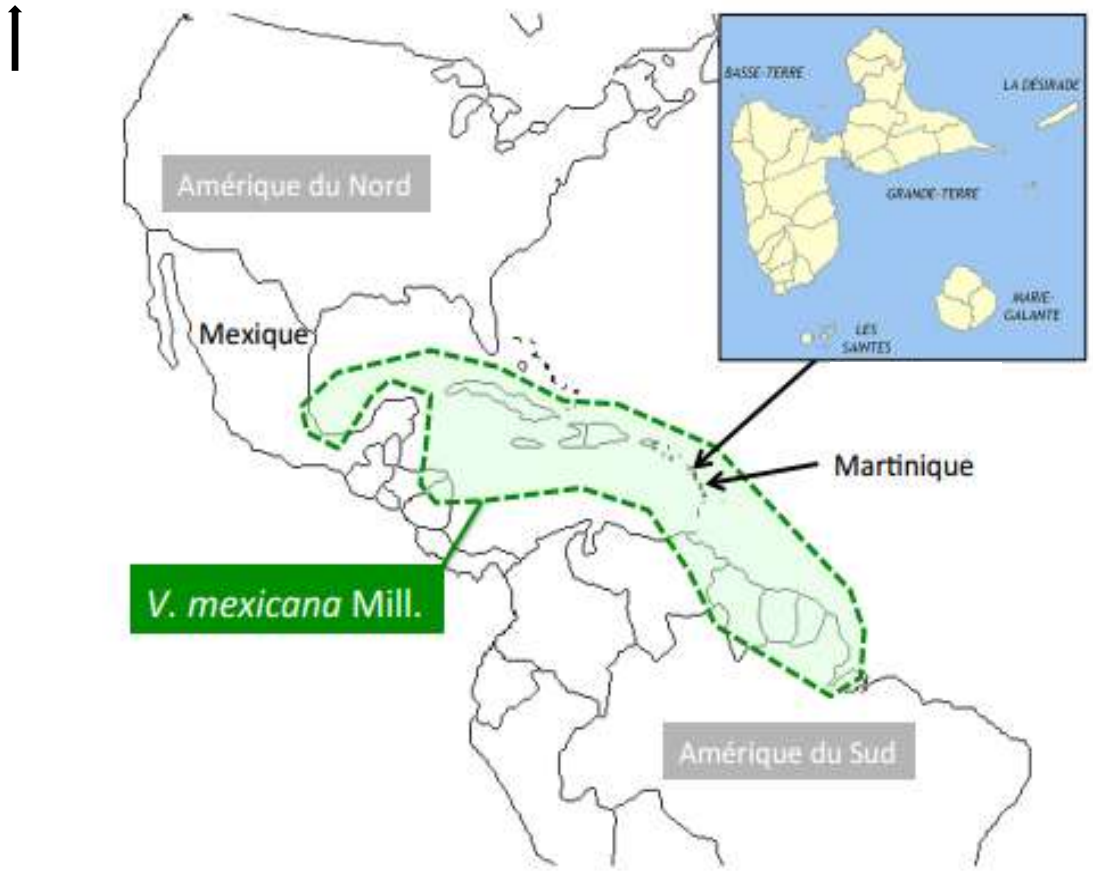

Figure 1 : Répartition géographique de l'espèce *Vanilla mexicana* selon Portères (1954) sur le continent américain (en vert)

Figure 2 : Description de l'espèce *V. mexicana* : plante entière (a), fleurs (b), planche d'herbier n° P00130634 (c).

Les principaux objectifs de ce projet sont d'étudier, de protéger et de valoriser les ressources de vanilliers présentes dans les territoires impliqués. Quatre régions insulaires participent à cette initiative : La Réunion et Mayotte (océan Indien), La Polynésie Française (océan Pacifique) et La Guadeloupe (Mer des caraîbes, océan Atlantique) (Figure 1) pour laquelle des populations naturelles de *Vanilla mexicana* Mill. vont être étudiées lors de ce stage.

Durant ce stage, le but est d'étudier grâce à des marqueurs microsatellites, les niveaux de diversité et de différenciation génétique des populations de *V. mexicana* échantillonnées en Guadeloupe, où l'espèce est indigène. Les conséquences des stratégies de reproduction de l'espèce et ses spécificités écologiques seront également étudiées afin de comprendre leur influence sur la diversité génétique et la structuration des populations. Ce modèle d'étude viendra compléter les études réalisées sur d'autres espèces de vanilliers employant une méthodologie similaire. Pour finir, des éléments de discussion autour de la conservation de l'espèce en Guadeloupe seront abordés.

I. Présentation de l'espèce *Vanilla mexicana* Mill.

L'espèce *V. mexicana* est une orchidée lianescente vivace avec une tige longue atteignant 10m, gracile, flexueuse, crassulescente, cylindrique, radicante avec des feuilles et des racines adventives sur chaque nœud et dont les entre-nœuds mesurent de 1 à 10 cm. Ses feuilles sont charnues, subsessiles et brièvement pétiolées. Ses inflorescences sont en racème de 3 à 12 cm de long, axillaires ou terminales. Son labelle blanc ou jaune citrin de près de 40 mm de long, est plus court que les sépales et brièvement soudé à la base de la colonne. Ses gousses de 10 à 25 cm de long sont allongées, pendantes, aplaties ou cylindriques, souvent arquées, et sont non-aromatiques (Portères, 1954) (Figure 2).

D'un point de vue taxonomique, l'espèce *V. mexicana* appartient à la famille des Orchidaceae, sous famille des Vanilloideae, tribu des Vanilleae, sous tribu des Vanillinae et genre *Vanilla* (Cameron, 2004, 2005). Selon la classification toujours employée, *V. mexicana* appartient à la section des Foliosae du genre *Vanilla* (Rolfe, 1896) et à la sous-section des Membranaceae (Portères, 1954) qui comprend des espèces ancestrales américaines aux feuilles membraneuses.

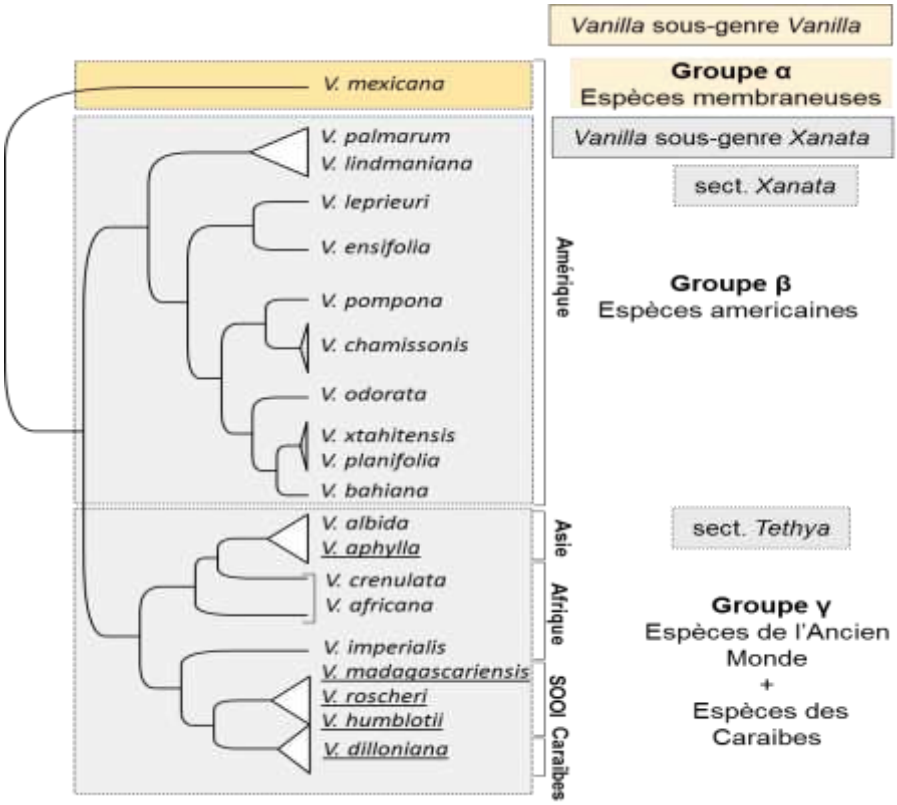

Figure 3 : Position basale de l'espèce *V. mexicana* (en orange) dans la phylogénie du genre *Vanilla* basée sur les marqueurs chloroplastiques rbcL, psaB, psbB et psbC (Gigant et al., 2011 ; Bouetard et al., 2010). Les origines géographiques des espèces sont indiquées (SOOI : Zone du Sud-Ouest de l'océan Indien). Les espèces soulignées appartiennent à la section des Aphyllae et le reste appartient aux Foliosae (Rolfe, 1896). La classification de Soto Arenas et Dressler (2010) est indiquée.

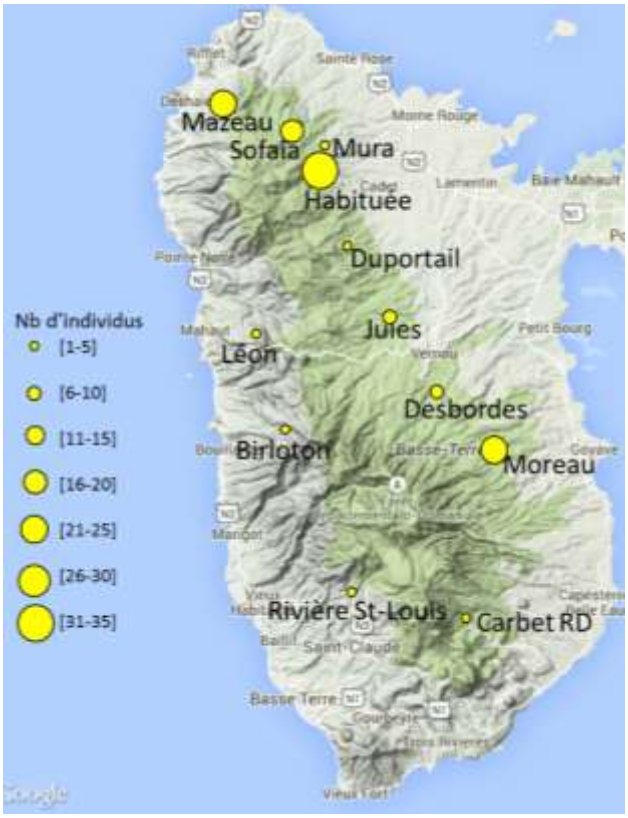

Figure 4 : Répartition de l'échantillonnage effectué par l'AGO en Basse Terre, Guadeloupe (Google earth).

En 2010, Soto Arenas et Cribb ont proposé une révision de la classification du genre *Vanilla* en se basant sur des données écomorphologiques et phylogénétiques. Le genre se scinde en deux sous-genres, dont le sous-genre *Vanilla* dans lequel *V. mexicana* se classe. Cette classification est confirmée par les études de Bouetard et al. (2010) qui placent ce sous-genre dans le groupe α. (Figure.3). Dans cette subdivision infragénérique, le sous genre *Vanilla* comprend deux groupes d'espèces : le groupe des *V. parviflora* et le groupe des *V. mexicana*. Le groupe *V. mexicana* comprend bien sûr l'espèce *V. mexicana*, mais aussi *V. costaricensis* Soto Arenas ined, *V. guianensis* Splitg., *V. inodora* Schiede., *V. martinezii* Soto Arenas ined, *V. methonica* Rchb. f. & Warsz., *V. oroana* Dodson et *V. ovata* Rolfe (Soto Arenas et Cribb, 2010). Toutes ces espèces se distribuent dans l'écozone néotropique allant de l'Amérique du Sud, l'Amérique Centrale jusqu'au Sud du Mexique (Soto Arenas et Cribb, 2010).

Dans cette révision du genre, *V. mexicana* et *V. inodora* sont considérées comme étant des espèces différentes alors qu'il est mentionné une possible synonymie dans la description de Portères en 1954. Cette synonymie est mentionnée par Feldmann dans la « Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique » quand il décrit *V. inodora* en tant que *V. mexicana* (Fournet, 2002). Dans le passé, un autre exemple de confusion taxonomique concerne *V. mexicana*. En effet, Portères (1954) décrit également un nouveau taxon, *V. pleei* comme étant endémique de Martinique. Il s'avèrera par la suite qu'il s'agissait d'un mélange probable d'échantillons de feuilles de *V. mexicana* et de fruits de *V. pompona* Schiede (Soto Arenas et Cribb, 2010 ; Feldmann, 2012). La classification des espèces de vanilliers est complexe et présente beaucoup de synonymies (Bory et al., 2008b), d' où la nécessité d'intégrer tous les outils disponibles pour caractériser les espèces. Géographiquement, *V. mexicana* se retrouve dans la partie nord de l'Amérique du Sud (Venezuela, Trinidad et Tobago) et se distribue principalement en Amérique Centrale, à Cuba, à Puerto Rico, à Haïti et aux Petites Antilles, voire jusqu'en Floride en Amérique du Nord (Soto Arenas et Cribb, 2010) (Figure 1). Des prospections par l'AGO (Association Guadeloupéenne d'Orchidophilie) ont été faites en Guadeloupe dans le cadre de ce stage et 131 échantillons de *V. mexicana* issus de 12 populations différentes ont été récoltés en Basse Terre (Figure 4).

Figure 5 : Stratégie de propagation de type phalanx. Les individus ayant le même génotype (clones) se retrouvent agrégés les uns autour des autres et autour du pied mère (Vallejo-Marìn et al., 2010).

II. Processus déterminant la diversité d'une population et sa structuration

La partie suivante abordera les paramètres qui déterminent la diversité génétique et la structuration d'une population. Les grands changements environnementaux menacent les espèces végétales, il s'avère que développer des approches combinées de la biologie de la reproduction et de la diversité génétique est nécessaire pour améliorer et optimiser la conservation de la biodiversité (Gigant et al., 2012).

II.2. Modes de reproduction

Le mode de reproduction d'une espèce est un paramètre important à considérer lorsque l'on s'intéresse aux flux de gènes (Ronfort et al., 2005). Plusieurs organismes supérieurs comme les plantes, présentent un mode de reproduction associant la reproduction sexuée et asexuée. La reproduction sexuée produit des graines possédant un mélange du patrimoine génétique issu des deux parents et la reproduction asexuée génère des clones identiques au parent.

II.1.1 Mode de reproduction asexué

Le mode de reproduction asexué chez les végétaux est principalement la reproduction végétative qui est une forme de bouturage naturel (Bory et al, 2010). Quatre-vingt pourcents des Angiospermes se reproduisent par clonalité (Klimes et al. 1997). Les plantes qui se reproduisent par voie végétative présentent plusieurs avantages écologiques comme la persistance aux habitats défavorables et la réduction du taux de mortalité (Vallejo-Marìn et al, 2010).

Chez les orchidées comme le genre *Vanilla*, la reproduction est mixte (Bory et al., 2008) bien que la reproduction végétative soit prédominante (Bory et al, 2010). Il est possible que dans les populations naturelles de vanilliers, plusieurs individus soient issus de la fragmentation naturelle d'un même individu. Il s'agit par ailleurs du mode de reproduction employé depuis plusieurs siècles pour multiplier les plants dans les vanilleraies de l'espèce *V. planifolia*.

Chez *V. humblotii* en condition naturelle à Mayotte (Gigant, 2012), l'agrégation des génotypes issus de la reproduction végétative autour du pied mère décrit une reproduction végétative de type phalanx (Figure 5). D'un point de vue génétique, tous ces individus agrégés autour du pied-mère sont des clones. Ainsi, la reproduction végétative agit sur la structuration spatiale de la diversité dans la population et peut jouer un rôle important dans la dispersion génétique à courte distance (Gigant, 2012). En l'absence de reproduction sexuée, une faible diversité génétique peut être attendue au sein de ces populations. Il existe des exceptions chez les vanilliers, où quelques espèces ne sont pas capables de faire de la reproduction végétative.

Tableau 1 : Taux de fructification de quelques espèces de *Vanilla* allogames et autogames (Gigant et al., 2011, 2014).

Espèces	Taux de fructification (%)	Mode de reproduction
V. barbellata[1]	18.2	allogame
V. chamissonis[2]	15.0	allogame
V. claviculata[1]	17.9	allogame
V. crenulata[3,4]	0.0	allogame
V. cristato-callosa[5]	6.6	allogame
V. dilloniana[1]	14.5	allogame
V. edwalii[6]	15.0	allogame
V. humblotii[7]	0.8	allogame
V. planifolia [1,8,9,10]	0.1 à 1.0	allogame
V. poitaei[1]	6.4	allogame
V. pompona subsp. grandiflora[5]	0.9	allogame
V. riberoi[5]	1.1	allogame
V. roscheri[7]	26.3	allogame
V. bicolor[5,11]	42.5 à 71.0	autogame
V. guianensis[5]	78.0	autogame
V. martinezii[12]	53.0	autogame
V. palmarum[5]	76.0	autogame

Ce sont les espèces comme *V. palmarum* Salzm. ex Lindl. (Soto Arenas, 2006 ; Bory et al., 2008c) ou *V. bicolor* (Householder et al, 2010 ; Pignal, 1994) Bory et al (2010) soupçonnent notamment que *V. mexicana* pourrait faire partie de ce groupe d'espèces, sans reproduction végétative (Bory et al., 2010 ; Cameron, 2010 ; Soto Arenas et Dressler, 2010), ce qui est confirmé par l'impossibilité de bouturer cette espèce (Feldmann P., com. pers.). Il est à noter que ces espèces ont la particularité d'être toutes autogames et capables d'autopollinisation spontanée.

II.1.2 Mode de reproduction sexué

Le système de reproduction sexué chez les plantes est allogame et/ou autogame. L'allogamie est la fécondation croisée entre deux individus distincts. Si les individus se reproduisent avec d'autres individus apparentés, on parle de régime de reproduction consanguin. A l'extrême de ce cas de Figure, un individu autofécondé est autogame.

Chez les vanilliers, certaines espèces sont autogames et d'autres allogames (Tableau 1). Le régime de reproduction sexué préférentiel chez les vanilliers, est allogame et pollinisateur-dépendant. Ce régime n'est que préférentiellement allogame puisque des tests d'autopollinisation artificielle ont effectivement montré l'autocompatibilité des fleurs des individus chez *V. bahiana* Hoehne, *V. chamissonis* Klotzsch , *V. madagascariensis* Rolfe, *V. dilloniana* Correll, *V. barbellata* Rchb. f. et *V. claviculata* Lindl.. L'allogamie n'est en effet garantie que par la structure florale qui présente un rostellum, barrière physique entre les organes reproducteurs mâle et femelle et qui limite l'autopollinisation (Gigant et al., 2012). L'intervention du pollinisateur est donc indispensable pour réaliser la pollinisation des espèces allogames. La reproduction sexuée des espèces allogames (Tableau 1) est généralement associée à un faible taux de fructification en conditions naturelles (Bory et al., 2008b ; Gigant et al, 2012).

La reproduction par autopollinisation spontanée (autogamie) se fait grâce à la présence de fluides stigmatiques qui permettraient la formation du tube pollinique et/ou grâce à un rostellum déshydraté ou réduit qui permettrait au pollen d'entrer en contact avec le stigmate de façon passive (Van Dam et al., 2010). Ce genre de mécanisme est retrouvé chez *V. palmarum* par la présence d'un rostellum épais (Gigant et al., 2011). Dans le tableau 1, les espèces *V. palmarum*, *V. savannarum*, *V. bicolor*, *V. guianensis*, *V. martinezii* et *V. griffithii* majoritairement autogames, présentent un très haut fruit sets en condition naturelle (Gigant et al., 2011). L'espèce *V. mexicana* est supposée faire partie de ces espèces autogames (Cameron, 2010 ; Soto Arenas et Dressler, 2010).

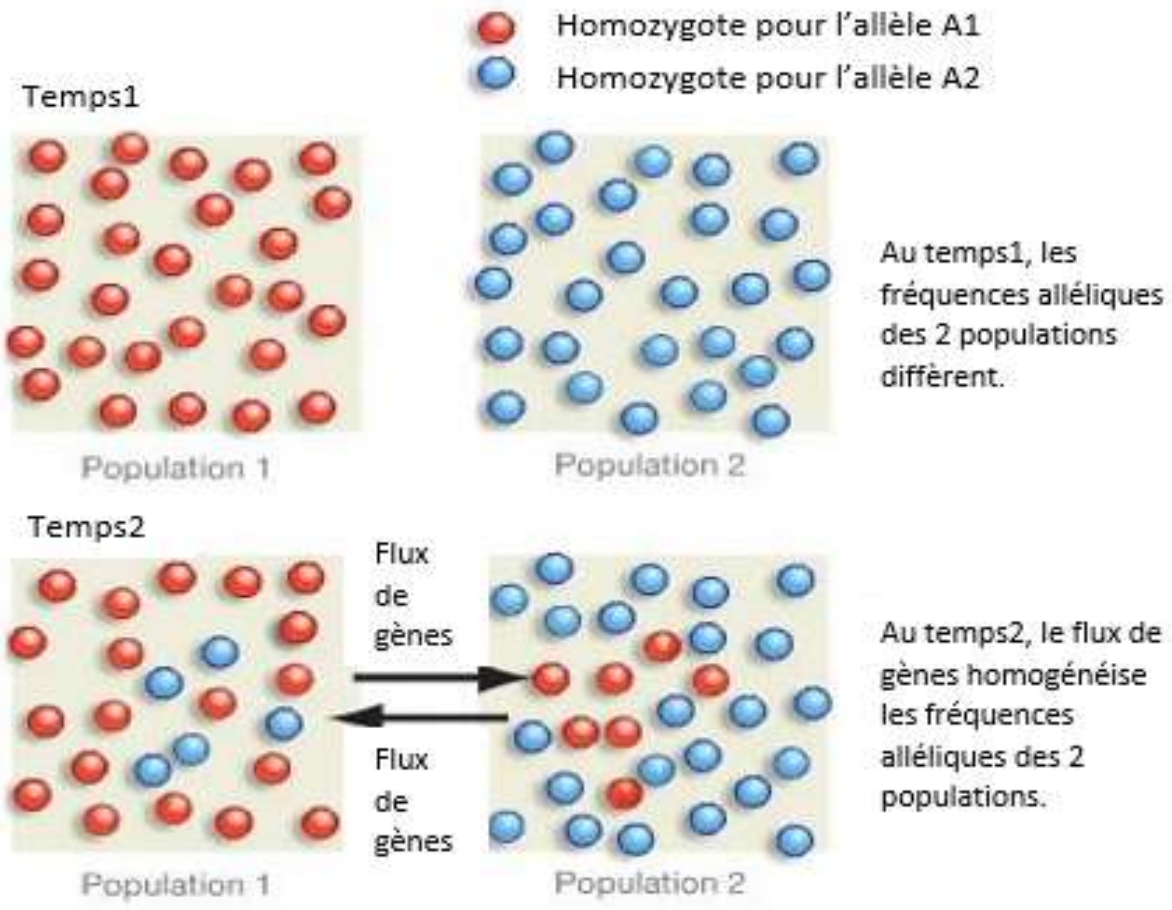

Figure 6 : Représentation de l'évolution des fréquences alléliques liée aux flux de gènes entre deux populations après un temps donné (source : http://www.studyblue.com/)

Les espèces allogames citées ont un taux moyen de fructification de 9,5% allant de 0,0% pour *V. crenulata* à 26,3% pour *V. roscheri* tandis que les espèces autogames ont un taux moyen de fructification de 70,2% allant de 53.0% pour *V. martinezii* à 78.0% pour *V. guianensis* (Tableau 1). Le taux de fructification des espèces autogames est supérieur à celui des espèces allogames. Ces taux de fructification sont en accord avec les données connues sur des orchidées tropicales montrant un taux de moins de 20.0% pour les espèces allogames et un taux autour de 77.0% pour les espèces autogames (Tremblay et al., 2005). Le système de reproduction des espèces (allogame/autogame) est un paramètre important à considérer lorsque l'on s'intéresse aux flux de gènes. Chez une espèce allogame, le pollen et les graines vont participer à la dispersion des gènes au sein de la population. A l'inverse, chez une espèce autogame, la dispersion efficace résulte principalement de la dispersion des graines (Ronfort et al., 2005). Ces systèmes ont des conséquences importantes sur l'organisation génétique de la diversité au sein de ces espèces car les populations d'espèces autogames sont plus fortement subdivisées et plus différenciées les unes des autres que les populations d'espèces allogames (Ronfort et al., 2005).

II.2. Flux de gènes

En génétique des populations, le flux de gènes est défini comme étant l'échange d'allèles entre populations (Figure 6) ou le passage efficace de gènes d'une population à une autre ou entre individus au sein d'une même population (Futuyama, 1998 ; Ronfort et al., 2005; Pegueroles et al., 2013). Le flux de gènes joue un rôle important dans l'organisation spatiale de la diversité génétique des populations. Il a généralement lieu au sein d'une même espèce bien qu'il existe des échanges de gènes interspécifiques, comme constaté dans le genre *Vanilla* avec l'existence d'hybrides naturels de *V. claviculata* et *V. barbellata* à Puerto Rico (Nielsen, 2000).

Chez les plantes, le flux de gènes est l'échange de pollen ou de graines entre populations résultant de la pollinisation, de la dispersion des graines et, éventuellement, de la dispersion de propagules ou d'organes végétatifs (Levin et Kerster, 1974 ; Ronfort et al., 2005). Le flux de gènes est la base de l'étude de la structure génétique et son effet principal est l'homogénéisation des fréquences alléliques entre les populations. En effet, une forte intensité de flux de gènes tend à uniformiser les allèles présents et les fréquences alléliques au sein des populations (Figure 6). Il est possible de mesurer indirectement l'importance des flux de gènes entre les populations grâce à l'indice FST de Wright (1969) en quantifiant les différences de fréquences alléliques entre populations (Ronfort et al., 2005). Le flux de gènes chez la majorité des plantes est assuré par des vecteurs abiotiques comme le vent et/ou biotiques comme les animaux (Levin et Kerster, 1974).

La dissémination par les animaux (zoochorie) s'avère plus efficace que par le vent (anémochorie) car elle augmente la probabilité de production de graines et réduit l'effort de production de pollen par ovule (Baker, 1963 ; Faegri et Van der Pijl, 1966 ; Levin et Kerster, 1974). La zoochorie est prédominante dans les communautés relativement proches par la distance surtout en forêts tropicales humides (Baker, 1959 ; 1963 ; 1970) tandis que l'anémochorie est plus rencontrée dans les habitats ouverts et à climat aride comme dans les prairies, les forêts tempérées et les savanes (Levin et Kerster, 1974).

Chez la majorité des Orchidaceae, les graines sont anémophiles puisqu'elles sont légères, sèches et de petite dimension facilement disséminées par le vent et la gravité (Ronfort et al., 2005). Pour les espèces de vanilliers aux fruits aromatiques, la dispersion des graines peut être zoophile car le vecteur de pollinisation pourrait être attiré par l'odeur du fruit. En Amérique, la dispersion de graines au sein de populations des espèces du groupe de *V. pompona* se ferait par les abeilles *Euglossa* (Hymenoptera, Apidae) attirées par l'odeur des gousses (Householder et al. 2010 ; Van Dam et al., 2010) et par les abeilles *Trigona* sp. (Householder et al., 2010). Pour *V. pompona* et *V. insignis*, cette dispersion se ferait par la chauve-souris (Soto Arenas et Dressler, 2010). A Mayotte, chez *V. humblotii*, le flux de pollens entomophile serait réduit à de très courtes distances dans la population entre des individus proches géographiquement. Le flux de graines, serait disséminé quant à lui par l'action conjointe du vent et de la gravité, et serait responsable des échanges génétiques intra populationnels sur des distances supérieures à 10m (Gigant et al., 2012). Il existe des facteurs de différenciation des populations, de natures écologiques et/ou génétiques, qui limitent le flux de gènes au sein des populations. Ils affectent la diversité génétique au sein des populations et pourraient réduire la taille de ces populations (Frankham, 1995) affectant l'évolution de la population.

II.2.1 Isolement génétique par la distance et l'écologie

Les flux de gènes entre les populations peuvent être réduits par la distance géographique (isolement par la distance ou isolation–by-distance/IBD) ou par la sélection divergente qui résulte d'une adaptation locale (isolement par l'écologie ou isolation- by-ecology /IBE) (Mallet et al, 2014b). L'isolement par la distance exprime la différenciation génétique en fonction de la distance (Jenkins et al., 2010). Selon Wright (1943), des paires de populations proches géographiquement les unes des autres peuvent être plus proches génétiquement que des populations éloignées par la distance à cause de la capacité de dispersion limitée des graines et du pollen. L'IBD significatif montre que la distance géographique est corrélée positivement avec la différenciation génétique (Hutchison et Templeton., 1999).

Cependant, si les habitats dans lesquels se trouvent les populations sont trop différents les uns des autres, la différenciation génétique des populations et la réduction des flux de gènes entre les populations seraient liées à l'IBE (Shaffer et Wolf, 2013). L'IBE crée une structuration génétique des populations selon le type d'habitat : des populations aux habitats similaires auront des compositions génétiques similaires. L'IBE peut être soit un isolement par l'adaptation (IBA), si la différenciation est due à un trait adaptatif de la population, soit un isolement par l'environnement (IBE), si la différenciation s'est faite par le biais de la variation des conditions écologiques entre les populations (Mallet, 2014). Dans le cas des populations de *Jumellea rossii* (Orchidaceae) à la Réunion, l'IBD et l'IBE interagissent dans la structuration génétique des populations. Néanmoins, l'hétérogénéité des habitats de cette espèce influencerait beaucoup plus la diversité génétique des populations que la distance géographique (Mallet et al., 2014b).

II.2.2 Fragmentation des populations

La fragmentation peut être définie à l'échelle du paysage comme étant la perte de l'habitat et la division de cet habitat qui diminuerait la taille des populations, induirait la formation de patches d'habitat et augmenterait le degré d'isolation des populations (McGarigal et Cushman 2002 ; Fahrig, 2003). Les populations fragmentées sont sujettes à une perte de la diversité allélique (Allphin et al. 1998 ; Ezard et Travis 2006 ; Aguilar et al., 2008), à une réduction de l'hétérozygotie (Allphin et al. 1998 ; Alemayehu et al. 2011), à une dérive génétique, à une dépression de consanguinité et à une réduction du flux génétique inter populationnel (Templeton et al.1990 ; Young et al. 1996). L'accumulation de ces effets néfastes de la fragmentation peut augmenter de façon significative les risques d'extinction de ces populations (Allendorf et Luikart, 2012 ; Frankham et al., 2010). Aguilar et al. (2008) montrent en effet dans leur méta-analyse des populations végétales que globalement les populations fragmentées présentent une perte de diversité génétique avec un faible taux d'allogamie, un faible taux d'hétérozygotie et un taux de consanguinité élevé. Les auteurs supposent que cela est dû à une rupture du flux de gènes entre les populations et/ou un changement du régime de reproduction des plantes dans les populations fragmentées. Toutefois dans le cas du genre *Vanilla*, à Mayotte (océan Indien), les populations de *V. humblotii* ont été fragmentées par la déforestation, et présentent une perte de diversité allélique, mais il s'avère que les populations présentent une forte diversité génétique et un fort taux d'hétérozygotie. Les auteurs supposent que le mode de reproduction végétatif et le nombre réduit de générations ont permis de maintenir le niveau de diversité génétique au sein des populations après fragmentation (Cook, 1983 ; Gigant et al., 2012).

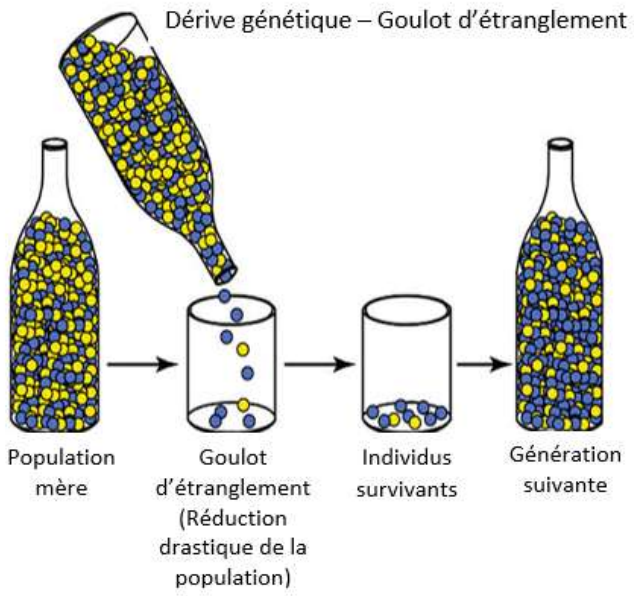

Figure 7 : Représentation de l'évolution des fréquences alléliques suite à un goulot d'étranglement et une dérive génétique (source : http://evolgen.wikispaces.com). La population mère subit un goulot d'étranglement par réduction de la taille de la population et constitue une nouvelle population à partir des individus survivants. La génération suivante se forme par phénomène de dérive génétique avec un pool allélique de composition différente de la population mère.

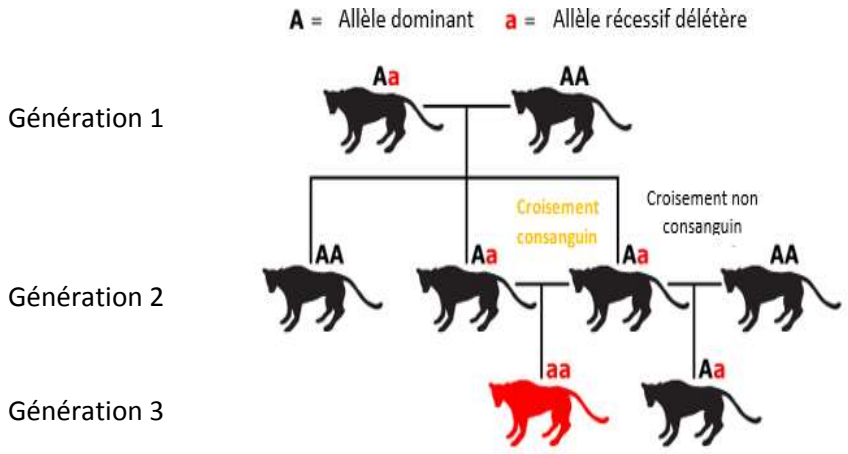

Figure 8 : Représentation du croisement consanguin de deux individus frères hétérozygotes de la génération 2 et de l'expression de l'allèle délétère « a » chez l'individu rouge dans la génération suivante (3) (source : http://evolution.berkeley.edu/)

Les impacts de la fragmentation sont très complexes et dépendent de plusieurs facteurs comme la taille, le degré d'isolement et les caractéristiques de la population (McGarigal et Cushman, 2002 ; Fahrig, 2003 ; Ezard et Travis, 2006 ; Leblois et al., 2006; Ouborg et al., 2006).

III. Conséquences de la dérive génétique, du goulot d'étranglement et de la consanguinité sur la diversité génétique

Des facteurs génétiques sont impliqués dans la diversification génétique des populations. Cette partie aborde trois processus dépendants du régime de reproduction des espèces et des flux de gènes au sein des populations. Ils sont liés et peuvent déterminer la capacité de la population à se maintenir dans le temps : le goulot d'étranglement, la dérive génétique et la consanguinité.

Le goulot d'étranglement est un processus au cours duquel, une population se forme à partir d'un nombre extrêmement réduit d'individus comme dans le cas des processus de colonisation des îles à partir de continent. Les structures alléliques de cette nouvelle population pourront être totalement différentes de la population d'origine (Figure 7). Indépendamment du taux de croissance, les populations soumises à des goulots d'étranglement tendent à perdre les allèles aux fréquences faibles, à présenter une réduction de leur polymorphisme et du nombre d'allèles par locus (Godt et Hamrick, 1991). Au cours des générations, l'intégrité de la population est menacée par la perte de sa diversité génétique (Lande, 1988). Le processus de dérive génétique se passe au sein d'une population par fixation de certains allèles de manière aléatoire à partir d'un pool d'allèles d'une population initiale de grande taille. Il s'observe lorsque le flux de gènes entre les populations mère - fille est rompu. Ce cas se présente par exemple lors d'une diminution drastique de la taille d'une population (Slatkin, 1987), comme lors d'un goulot d'étranglement (Figure 7). Dérive génétique et goulot d'étranglement peuvent agir ensemble et participer à la perte de la diversité génétique des populations ce qui réduit la capacité d'adaptation des populations aux modifications de l'environnement et en augmentant ainsi la probabilité d'extinction d'une population restreinte (Frankel et Soulé, 1981 ; Burgman et Neet, 1989). La consanguinité est le croisement entre individus apparentés (Figure 8). Elle est favorisée par les petits effectifs des populations où les échanges génétiques sont limités. Elle peut entraîner l'expression de gènes récessifs et délétères (Burgman et Neet, 1989). Ces gènes désavantageux qui ne s'exprimaient pas en étant hétérozygotes ont une probabilité plus importante de devenir prédominants dans une génération d'individus issus de croisements consanguins.

La consanguinité augmente le taux d'homozygotes dans la population et peut entrainer une baisse significative de la fitness de reproduction chez les espèces d'animaux et de plantes surtout chez les espèces exclusivement allogame, on parle alors de dépression de consanguinité (Charlesworth et Charlerworth, 1987 ; Dudash, 1990 ; Falk et Holsinger, 1991 ; Fenster, 1991 ; Johnston, 1992 ; Dole et Ritland, 1993 ; Heschel et Paige, 1995 ; Frankham, 1995, 2005). La consanguinité combinée à la taille modérée des populations réduit la diversité génétique au sein des populations et contribue également au déclin des populations surtout chez les espèces à faible taux de reproduction (Burgman et Neet, 1989 ; Frankham, 1995).

La conséquence directe de la perte de diversité génétique, selon qu'elle est liée à un ou plusieurs des phénomènes énoncés ci-dessus, est la diminution du nombre d'allèles et la diminution du potentiel adaptatif de ces espèces à survivre aux modifications environnementales et notamment aux conditions climatiques extrêmes, aux pollutions et aux maladies (Burgman et Neet, 1989 ; Pray et al., 1994 ; Vrijenhoek, 1994 ; Frankham, 1995, 2005).

IV. Problématique, objectifs de l'étude et méthodologies envisagées

V. mexicana est une espèce ancestrale qui est indigène de la Guadeloupe. En 2013, des échantillonnages de l'espèce ont été réalisés en Guadeloupe par l'association AGO (Association Guadeloupéenne d'Orchidophilie) sous l'égide du Parc National de la Guadeloupe afin de récolter des fragments pour en extraire l'ADN et de géoréférencer les individus présents sur la Basse Terre. Le stage visera à améliorer les connaissances sur cette espèce. La problématique sera d'évaluer les niveaux de diversité au sein des populations de *V. mexicana* en Guadeloupe. Pour cela, des questions sont soulevées par le sujet :

- Quel est le mode de reproduction de *V. mexicana* ? Et quelle est l'influence du mode de reproduction sur la structure génétique des populations ?
- Quelle est l'intensité des flux de gènes intra- et inter-populationnelles ?
- Les populations de *V. mexicana* sont-elles structurées sous l'hypothèse de populations dont les individus se reproduisent de manière aléatoire entre eux (panmixie) ? Si structure génétique il y a, quels sont les facteurs influençant la structure génétique de ces populations ?
- Quelles sont les propositions, si nécessaire, de mesures de gestion de la biodiversité de l'espèce *V. mexicana* en Guadeloupe ?

MATERIEL ET METHODES

I. Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué en 2013 par l'Association Guadeloupéenne d'Orchidophilie (AGO) sous l'égide du Parc National de la Guadeloupe dans le cadre du projet VaBiome. Deux à trois prospecteurs de l'association ont assuré l'inventaire des populations de *V. mexicana* et le conditionnement du matériel végétal. Ils ont effectué 22 tracés représentant 135 km réparties autour du massif de Basse-Terre en Guadeloupe en faisant en sorte de recouvrir toutes les zones écologiques. Ainsi, ils ont pu prospecter dans les zones au vent à moyenne altitude (150 à 750m) au sein de 6 habitats sur les 10 que compte Basse–Terre (Goulié, 2014). Des prélèvements de feuilles ont été effectués et le matériel végétal déshydraté à l'aide de silicagel a été envoyé au laboratoire (UMR PVBMT) du 3P de Saint-Pierre par courrier postal.

Ainsi, 131 échantillons de *V. mexicana* ont été récoltés sur 12 sites de Basse-Terre (Figure 4). La dénomination des populations correspond au nom de la localité d'échantillonnage. Chaque individu est muni de ses coordonnées GPS et d'un code terrain (Annexe 1), il est ensuite intégré dans la base de données de la collection du CRB Vatel du Cirad de La Réunion avec un numéro d'accession. Pour les analyses génétiques, 2 autres accessions de *V. mexicana* de la Martinique et du Mexique sont fournis par le CRB VATEL pour compléter notre étude.

II. Evaluation du taux de fructification naturelle

De Juin à juillet 2014, sur 2 individus de la population Mazeau distants d'environ 2 km, le taux de fructification a été calculé à partir de 16 inflorescences de *V. mexicana* dont 8 sont ensachées avant l'ouverture des fleurs et 8 laissées sans protection (manipulations AGO). Ce taux est un ratio entre le nombre de fruits formés au 30ème jour par le nombre de fleurs au jour 0. Ensuite, le taux de fructification naturelle dit « témoin », c'est-à-dire sans protection est comparé au taux d'autofécondation spontanée à 30 jours à l'aide d'un test de Student réalisé avec le logiciel R v.3.1.1 (R Core Team, 2014).

III. Analyse génétique et marqueurs utilisés

III.1. Extraction d'ADN

L'ADN de chaque échantillon récolté a été extrait à partir de 0,020 à 0,025 g de feuilles déshydratées. La matière végétale est broyée à l'aide de l'appareil TissueLyser II (Qiagen) pendant une durée de 8 minutes à une fréquence de 30 Htz en vérifiant la finesse de la poudre. Dans le cas contraire, un broyage supplémentaire avec les mêmes paramètres est effectué.

Tableau 2: Caractéristiques des 6 marqueurs microsatellites utilisés (F : Forward, R : Reverse) (Gigant et al., 2011b).

Marqueurs	Motif répété	Séquence	Fluorochrome
HU03-F HU03-R	(ga)24	GTCGCATTCACATAGCTTCG CTTCCTACCGCTGTCGTCT	FAM
HU04-F HU04-R	(ag)13	GGATACTTCCGGTGACTCCA GCTCTGGCTCTGTGGTTAGG	FAM
HU06-F HU06-R	(tg)10	CTTGGTTGTTCTGCTGGATG CCCTAGAACCCATGTCTTGC	PET
HU07-R HU07-F	(ga)16	CCACGTAGATCAAACACAGCA AAGAAACTGTTAGAAATCCCAAGC	NED
HU09-F HU09-R	(ag)14	CGCCGGATACTTCCAATTAC TGATTCACGCATGTAAACGAG	VIC
RO05-R RO05-F	(ga)15	GCTATTTCCCACGAACCCTA AACCATTGCCAGAAGCCTAA	NED

L'ADN est ensuite extrait de la poudre suivant le protocole DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, France) présenté en annexe 2. L'ADN est finalement élué dans 70 µl de tampon d'élution. La qualité de l'ADN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et révélation au bromure d'éthidium (BET). Les échantillons sont dilués en fonction de la gamme d'intensité de bande établie préalablement grâce à des concentrations d'ADN connues afin d'avoir une concentration proche de 10ng/µl pour la suite des manipulations. Une analyse complémentaire de la qualité et de la concentration en ADN a été réalisée par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop V8000 (Nanodrop Technologies, USA).

III.2. Purification des ADN

Pour assurer le succès des amplifications, une série de purification selon le protocole GeneClean® TurboKit (Annexe 3), est réalisée sur 74 échantillons présentant une pureté insuffisante, estimée au Nanodrop, (ratio des densités optiques 260/280 hors de la gamme de validité comprise entre 1,7 et 2).

III.3. Mise au point de marqueurs microsatellites

La mise au point chez *V. mexicana* de marqueurs microsatellites est basée sur l'utilisation de 14 marqueurs microsatellites de *V. planifolia* (Bory et al., 2008d) et de 19 marqueurs microsatellites de *V. humblotii* et *V. roscheri* développés par Gigant (2011b). Un tri préliminaire a été effectué à partir de ces marqueurs par Gigant (résultats non publiés). Initialement, un panel de 14 marqueurs microsatellites dont 5 couples d'amorces développés chez *V. planifolia* et 9 couples chez *V. humblotii* et *V. roscheri* est ainsi sélectionné pour un signal de transférabilité à *V. mexicana*. Cependant, après avoir testé ces amorces sur un plus grand nombre d'échantillons de *V. mexicana*, uniquement 6 de ces 14 couples d'amorces (Tableau 2), par ailleurs tous développés chez *V. humblotii* et *V. roscheri*, se sont avérés transférables à *V. mexicana* et donnant des résultats répétables.

III.4. Amplification des fragments d'ADN microsatellites

Les réactions PCR (Polymerase Chain Reaction) ont donc réalisées à partir de 6 couples d'amorces microsatellites : HU03, HU04, HU06, HU07, HU09, RO05 marqués par des fluorochromes émettant des couleurs à des longueurs d'ondes différentes (Tableau 2). Le volume total de réaction est de 15µl dont 7,5 µl de buffer Multiplex (Qiagen), 0,2 µl de chaque amorce à 20 mM, 5,1 µl d'eau HPLC et 2 µl d'ADN à une concentration estimée de 10ng/µl. L'appareil utilisé pour l'amplification de l'ADN est le thermocycleur PCR System 9700 (Applied Biosystems, France). Le programme utilisé est le suivant : 2 minutes de pré-dénaturation à 95°C, 45 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95°C, de 45 secondes d'hybridation des amorces à 57°C et d'1 minute d'élongation à 72°C, ensuite une élongation finale de 7 minutes à 72°C.

Le contrôle de l'amplification se fait par électrophorèse sur du gel d'agarose à 2% (migration à 110V pendant 1 heure et 30 minutes, révélation au BET sous UV, et visualisation de la fluorescence des fragments d'ADN avec le logiciel Clara Vision (Perfect Image). Les produits PCR sont dilués au 1/10ème, 1/20ème, 1/30ème, 1/40ème suivant l'intensité des bandes sur le gel.

III.5. Génotypage

Le génotypage des individus a été effectué par migration des produits amplifiés avec le séquenceur ABI 3130Xl (Applied Biosystems) selon le protocole en annexe 4. Pour cela, une quantité de 1µl des produits d'amplification microsatellites dilués au préalable est mélangée à 10,3 µl de formamide et 0,7µl du marqueur de taille Gene Scan 500 Liz Size Standard (Applied Biosystems). Le résultat de la migration par capillarité est visualisé à l'aide du logiciel GeneMapper v.4 (Applied Biosystem). Il est important de distinguer les profils de génotypage des pics parasites ou « stutters ». Pour les 6 amorces sélectionnées, différents jeux de données ont été constitué en fonction des besoins des analyses.

IV. Analyses statistiques de génétique

IV.1. Diversité génétique

Après la détermination des tailles des allèles pour chaque marqueur et chaque individu échantillonné, les analyses statistiques ont été effectuées avec plusieurs logiciels. La conversion des fichiers de données a été principalement effectuée avec le logiciel GenAlex v.6.4 (Peakall et Smouse 2006).

Un jeu étendu de données comprenant toutes les accessions de la Guadeloupe, Martinique et Mexique (133 individus) pour les 6 loci microsatellites est utilisé pour calculer le nombre total d'allèles pour chaque locus (Na) à l'aide du logiciel GenAlex et pour étudier le niveau de polymorphisme et la présence d'allèles privés à l'échelle régionale. Par la suite, les accessions Martinique et Mexique ont été retirées du jeu de données initial pour le calcul du nombre d'allèles privés par population (Ap), des hétérozygoties observées (Ho), des hétérozygoties attendues dans le cas d'une population à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (He) et des indices de fixation (Fis) à l'aide du logiciel GenAlex. Pour les analyses à l'échelle des populations, seul le jeu complet de données obtenu pour 3 marqueurs HU03, HU07, HU09 est utilisé (51 individus). Le Fis ou coefficient de consanguinité indique un déficit ou un excès en hétérozygotes dans les populations étudiées, informe sur le régime de reproduction des populations en faisant un ratio de He et Ho. Le logiciel Genepop v.4.0 (Raymond et Rousset, 1995) permet de tester la déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg par les tests exacts multi-locus d'écart à cet équilibre de Hardy- Weinberg, utilisant des chaînes de Markov paramétrées systématiquement avec les valeurs par défaut (Guo et Thompson, 1992).

Les tests sur les déséquilibres de liaison entre loci ont été réalisés à l'aide de Genepop avec un test exact de Fisher prenant en compte toutes les paires de marqueurs dans chacune des populations. L'absence d'allèles nuls au sein des populations est vérifiée en faisant des sous-jeux de données sans valeur manquante pour chaque locus à partir du jeu de données à 131 individus avec le logiciel Micro-Cheker v. 2.2 (Van Oosterhout et al. 2004).

IV.2. Différenciation génétique

Les analyses suivantes sont réalisées sur le jeu complet de données Guadeloupe (51 individus, 3 loci). La différenciation génétique est estimée par le calcul du Fst par paire de populations à l'aide du logiciel Genepop en utilisant la méthode de Raymond et Rousset (1995). Le Fst est un ratio entre l'hétérozygotie théorique moyenne dans les sous-populations (Hs) et l'hétérozygotie théorique dans une population globale (Ht). La significativité de la différenciation génétique est réalisée avec le même logiciel en utilisant la méthode de Weir & Cockerham (1984).

Des analyses factorielles de correspondance ont été effectuées à partir du logiciel Genetix v. 4.5.2 (Belkhir et al. 2004) afin d'avoir un aperçu de la répartition des génotypes par population. Pour cela les allèles susceptibles d'influencer trop fortement la distribution des individus et nuisant à leur représentation graphique sont écartés des analyses. La corrélation entre la distance géographique et la distance génétique entre génotypes est également calculée à partir du logiciel GenAlex en utilisant un test de Mantel avec 10^3 permutations.

IV.3. Structuration des populations

La structuration génétique des populations (sur le jeu complet de données, 51 individus et 3 loci) est déterminée par le logiciel InStruct (Gao et al., 2007). Il permet d'estimer le nombre probable de populations à l'équilibre sur la base des fréquences alléliques. L'assignation des individus à une population se base sur les probabilités postérieures bayésiennes d'appartenance à K groupes où K est défini à priori par l'utilisateur. Le modèle utilisé pour ces analyses est le modèle sans introgression (« no admixture ») approprié pour les populations réduites et isolées. Ce modèle suppose que chaque individu est issu d'une seule des populations échantillonnées (Pritchard et al., 2000) et que les populations ne sont pas sous l'influence de populations non échantillonnées. Une valeur de vraisemblance permet de définir le K optimal, à partir d'une série de 5 répétitions par K testé, de 1 à 15. Chaque répétition est caractérisée par un burnin de 5×104 itérations et une période de simulation de 5× 105 générations de chaînes de Markov. A partir du résultat issu de l'analyse, le nombre de K le plus vraisemblable est déterminé par la méthode d'Evanno et al., (2005) qui calcule les valeurs du paramètre ΔK. Le K optimal prend la valeur de K pour lequel le ΔK est le plus élevé. Le logiciel Distruct v.1.1. (Rosenberg, 2004) est utilisé pour représenter graphiquement la distribution des génotypes dans chacun des clusters définis par les sorties InStruct. Une représentation de la distribution des clusters à l'échelle de la Guadeloupe est ensuite réalisée à l'aide de QGIS v.2.4 (2012).

Tableau 3: Mode de reproduction de *V. mexicana* en Guadeloupe. Témoin : inflorescences sans protection, Ensachée : inflorescence protégée, Nb_fl : nombre de fleurs, FRUCTI_MOY : taux de fructification moyen à 30 jours, MOY_SE : valeur moyenne et écart-type, t.test : pvalue du test de Student, NS : non significatif.

	JOUR 0		FRUCTI_MOY (%)	
	Témoin Nb_fl	Ensachée Nb_fl	Témoin	Ensachée
MAZEAU 116	6	6	50,0	50,0
	6	5	83,3	80,0
	6	5	66,7	60,0
	6	6	50,0	50,0
MAZEAU 4	6	3	33,3	100,0
	5	6	80,0	50,0
	6	4	16,7	25,0
	4	6	50,0	16,7
TOTAL	**45**	**41**		
MOY ± SE			**53,7±21,1**	**53,9±25,3**
T.TEST			**0,30 (NS)**	

Tableau 4: Indices de diversité génétique définis par Genepop et Genalex. Na(Guad): nb d'allèles total à l'échelle régionale (nb d'allèles total en Guadeloupe) par locus, Taille (pb): gamme de taille des allèles, pol_reg: polymorphisme régional, pol_Guad: polymorphisme local au niveau de la Guadeloupe, N: nb total d'individus à l'échelle régionale (nb total d'individus en Guadeloupe), A : présence d'allèle nul dans au moins une population, He: hétérozygotie attendue avec l'écart-type, Ho: hétérozygotie observée avec l'écart-type, Fis: indice de fixation avec l'écart-type, HW: déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg avec pvalue * (<0,05) ou NS (> 0,05).

	REGION				GUADELOUPE					
Locus	**Na (Guad)**	**Taille (pb)**	**Pol_rég**	**Pol_Guad**	**N (Guad)**	**A**	**He**	**Ho**	**Fis**	**HW**
HU03	4(4)	119 – 127	Oui	Oui	111(110)	Non	0,25±0,06	0,36±0,11	-0,39±0,11	NS
HU04	3(1)	150 – 161	Oui	Non	42 (40)	Non	0,00	0,00	-	-
HU06	4(4)	252 – 260	NA	Oui	43 (43)	Oui	0,23±0,06	0,15±0,05	0,32±0,13	*
HU07	3(3)	165 – 171	Oui	Oui	57 (55)	Oui	0,24±0,07	-	1,00±0,00	*
HU09	6(5)	109 – 203	Oui	Oui	126 (125)	Oui	0,34±0,07	0,25±0,06	0,24±0,10	*
RO05	2(1)	178 -180	Oui	Non	48 (47)	Oui	0,00	0,00	-	-
Moyenne	**3,67(3)**								**0,38**	*****

RESULTATS

I. Biologie de la reproduction de *V. mexicana*

Pour les 2 individus, sur les 86 boutons terminaux de départ (J0), 45 sont devenus des fruits dont 24 sur 45 pour les inflorescences témoins et 21 sur 41 pour les inflorescences ensachées (Tableau 3). Il n'y a pas de différence significative entre le taux de fructification naturel et le taux d'autofécondation spontanée obtenu à partir de fleurs ensachées donc l'autofécondation spontanée (53,9%) explique la totalité des fructifications naturelles observées (53,7%) pour l'espèce *V. mexicana*.

II. Analyse de la diversité génétique

Les 6 marqueurs microsatellites développés chez *V. humblotii* et *V. roscheri* et transférables chez *V. mexicana*, sont polymorphes à l'échelle régionale (Guadeloupe- Martinique- Mexique) et parmi eux, 4 sont polymorphes à l'échelle de la Guadeloupe. Les marqueurs HU04, HU09 et RO05 ont révélé 4 allèles privés chez l'individu du Mexique sur les 18 allèles privés détectés à l'échelle de la région dont 1 à l'état d'hétérozygote et les 3 autres homozygotes. Le nombre d'individus génotypés avec succès dans la région varie pour chaque locus, il va de 43 individus pour le locus HU06 à 126 individus pour le locus HU09 (Tableau 4). Au total, 51 individus sur les 131 de la Guadeloupe ont été génotypés avec succès pour 3 marqueurs microsatellites (HU03, HU07, HU09) avec 11 populations : Birloton, Carbet, Desbordes, Duportail, Habitué, Jules, Léon, Mazeau, Moreau, Rivière Saint-Louis et Sofaia.

II.1 Informativité des loci

Sur l'ensemble des populations à l'échelle régionale et pour tous les loci, le nombre d'allèles par locus Na varie de 2 allèles pour RO05 à 6 allèles pour HU09 et le nombre d'allèle moyen par locus est de 3,67 (Tableau 4). Sur les 6 loci étudiés pour toutes les populations, 3 ont des valeurs de Fis indiquant une déviation significative à l'équilibre de Hardy- Weinberg due à un déficit en hétérozygotes. Bien qu'il y ait un locus avec un excès en hétérozygotes (HU03), l'ensemble présente une inadéquation à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour tous les loci et toutes les populations (Tableau 4). Le polymorphisme révélé est plus important à l'échelle régionale, avec 22 allèles révélés et 6 loci polymorphes, alors que seulement 18 allèles et 4 loci polymorphes sont révélés en Guadeloupe. En ce qui concerne les déséquilibres de liaisons, les résultats de pvalue indiquent qu'il n'y a pas de déséquilibre de liaison significatif entre les différents loci considérés.

Tableau 5: Indices de diversité génétique définis par Genepop et Genalex. N : effectifs, Na: nb d'allèles total en Guadeloupe par population, He: hétérozygotie attendue avec l'écart-type, Ho: hétérozygotie observée avec l'écart-type, Fis: indice de fixation avec l'écart-type, HW: déviation à l'équilibre d'Hardy-Weinberg *pvalue<0,05 et NS pvalue> 0,05. Les populations ayant un effectif supérieur à 5 individus ont des valeurs mises en gras. Le Fis est calculé pour les populations avec un nombre d'allèles supérieur ou égal à 4.

Population	Désignation	N		Ap	He	Ho	Fis	HW
BIRLOTON	**Birlo**	1	4	0	017±0,17	0,33±0,33	-1,00±0,33	-
CARBET	**Carbe**	1	3	0	0	0	0	-
DESBORDES	**Desbo**	4	7	1	0,47±0,05	0,41±0,22	0,09±0,46	NS
DUPORTAIL	**Dupor**	1	3	0	0	0	0	-
HABITUEE	**Habit**	4	6	0	0,26±0,13	0,25±0,14	0,03±0,29	NS
JULES	**Jules**	1	4	0	0,17±0,17	0,33±0,33	-1,00±0,33	-
LEON	**Léon**	2	6	1	0,38±0,19	0,17±0,17	0,6±0,33	NS
MAZEAU	**Mazea**	**14**	**6**	**0**	**0,32±0,10**	**0,12±0,06**	**0,45±0,31**	*
MOREAU	**Morea**	**13**	**7**	**0**	**0,33±0,16**	**0,20±0,10**	**0,43±0,34**	*
RIVS	**Riv S**	3	5	0	0,32±0,16	0,11±0,11	0,67±0,27	NS
SOFAIA	**Sofai**	**7**	**6**	**0**	**0,35±0,18**	**0,14±0,14**	**0,66±0,28**	*
	Moyenne				0,25±0,04	0,19±0,05	0,25±0,12	*

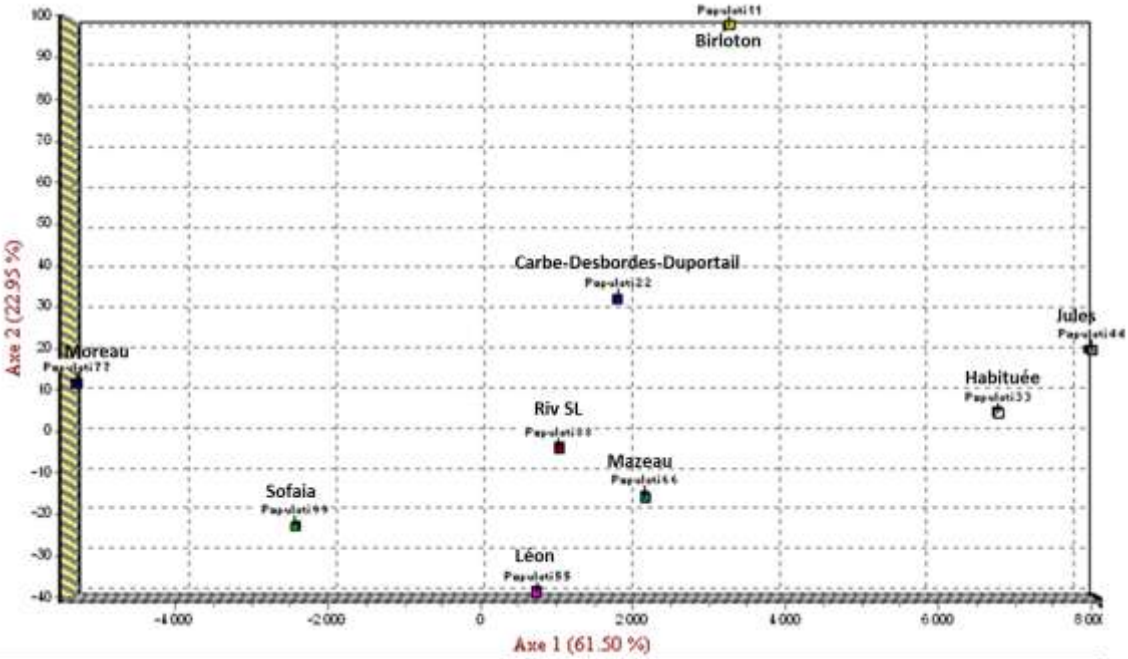

Figure 9: Analyse Factorielle des Correspondances pour les génotypes de *V. mexicana* à l'échelle de la Guadeloupe. Les axes 1, 2 sélectionnés représentent 84,45% de la variabilité totale des données.

Dans la population de Mazeau, le locus HU07 présente un allèle nul mais de fréquence négligeable pour en tenir compte dans nos analyses De plus, les études effectuées avec ces marqueurs microsatellites chez d'autres espèces de *Vanilla* comme chez *V. planifolia*, *V. humblotii* et *V. roscheri* (Bory et al., 2008d ; Gigant et al., 2011b) ont montré que les loci ne présentaient pas d'allèle nul de fréquence suffisamment importante dans les populations étudiées.

II.2. Diversité génétique à l'échelle de la Guadeloupe

Les analyses de la diversité génétique portent sur le jeu complet de données (51 individus, 3 loci). Le nombre limité d'individus échantillonnés pour certaines populations est susceptible de biaiser les analyses, ainsi les résultats à considérer porteront sur les populations avec un effectif supérieur à 5 individus. Le nombre d'allèles par population varie de 6 pour la population de Sofaia (7 individus) et de Mazeau (14 individus) à 7 pour Moreau (13 individus). Il existe des allèles privés au nombre de 2 appartenant à la population de Desbordes et Léon (Tableau 5). Les taux d'hétérozygotie observée vont de 0,12 pour Mazeau à 0,20 pour Moreau. Pour tous les loci, les populations de Mazeau, de Moreau et de Sofaia ont des valeurs de Fis indiquant une déviation significative à l'équilibre de Hardy- Weinberg due à un déficit en hétérozygotes et l'analyse globale de Fis pour toutes les populations suggère également le même résultat (Tableau 5). Si on considère les populations ayant un faible effectif, elles sont en adéquation à l'équilibre de Hardy-Weinberg, mais comme elles ne permettent pas de faire des analyses robustes ce résultat ne peut pas être pris en considération.

II.3. Différenciation génétique

L'AFC exploratoire selon 2 axes est réalisé par Genetix sur le jeu complet de données à 51 individus. Afin d'obtenir la meilleure représentation de la distribution des individus dans ces analyses, les allèles HU09 à 203 pb et 187 pb sont mis en données supplémentaires. Les 2 axes sélectionnés représentent 84,45% de la variabilité des données (Figure 9). Les populations ne semblent pas présenter de structuration liée à la distribution géographique comme par exemple la population de Sofaia éloignée de celle d'Habituée sur la représentation en AFC mais qui sont géographiquement proches l'une de l'autre. Les populations à faible effectif paraissent intéressantes dans les AFC d'un point de vue génétique car elles semblent être différentes des autres populations comme dans le cas de la population de Birloton et de Léon qui s'écartent des autres populations dans les AFC. Les calculs des Fst permettent d'estimer la différenciation génétique pour chaque paire de populations.

Tableau 6: Matrice de différenciation génétique (Fst) pour chaque paire de populations de *V. mexicana*. Les paires de populations ayant un effectif supérieur à 5 individus ont des valeurs de Fst mises en gras (*pvalue<0,05).

Population	BIRLO	CARBE	DESBO	DUPOR	HABIT	JULES	LEON	MAZEA	MOREA	RIV S
CARBE	0.83									
DESBO	-0.22	0.15								
DUPOR	0.83	-	0.15							
HABIT	0.30	-0.37	0.23	-0.37						
JULES	0.67	0.50	0.11	0.50	-0.32					
LEON	-0.06	-0.84	0.02	-0.84	0.06	-0.43				
MAZEA	0.29	-0.34	0.15*	-0.34	0.05	-0.09	-0.11			
MOREA	0.41	0.46	0.09*	0.46	0.48*	0.48*	0.13	**0.29***		
RIV S	-0.13	-0.48	-0.08	-0.48	0.05	-0.13	-0.29	-0.12	0.18*	
SOFAI	0.34	0.12	0.08*	0.12	0.30*	0.25	-0.21	**0.08***	**0.03**	-0.04

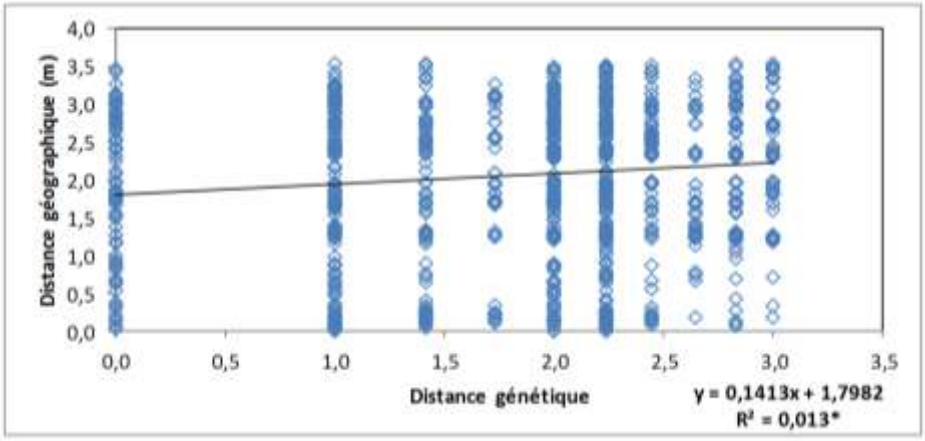

Figure 10: Régression linéaire entre les distances génétiques et les distances géographiques traduisant le test de Mantel (*pvalue<0.05).

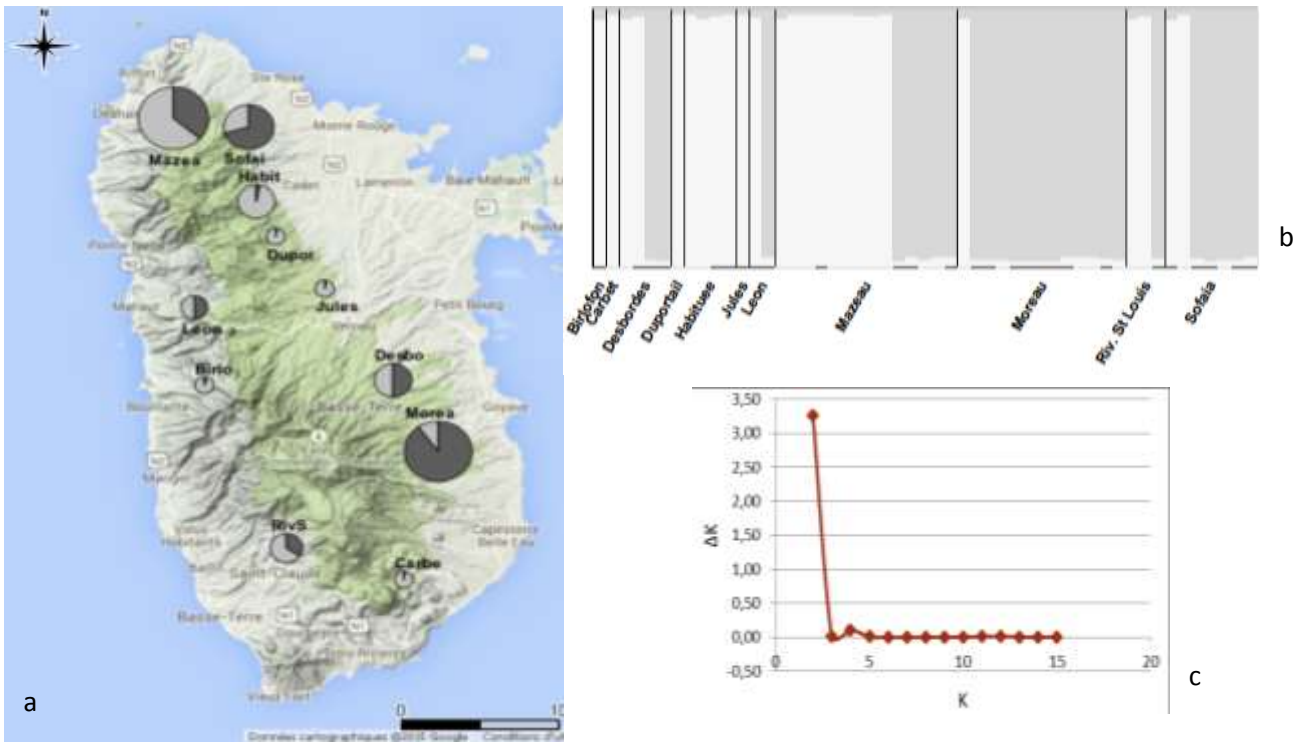

Figure 11: (a) Distribution de l'assignation moyenne de chaque population de *V. mexicana* en Guadeloupe à un cluster (K=2) à l'aide du logiciel InStruct selon la méthode d'Evanno et al. (2005) et avec ΔK= 3,26 à K=2. La taille des camemberts varie en fonction du nombre d'individu dans chaque population (cluster 1 : gris clair, cluster 2 : gris foncé). (b) Histogramme des probabilités postérieures d'appartenance bayésienne à un cluster (K=2) pour chaque individu (cluster 1 : gris clair ; cluster 2 : gris foncé). (c) Détermination du K optimal selon la méthode d'Evanno et al., 2005 (K=2).

Comme ils sont basés sur les fréquences alléliques, les calculs sur les populations réduites ne sont pas retenus car ils ne sont pas valables. Pour les populations de Mazeau, de Moreau et de Sofaia, les valeurs de Fst vont de 0,03 à 0,29.

La population de Sofaia n'est pas significativement différenciée de celle de Moreau (pvalue >0,05) mais ces deux populations sont significativement différentes de Mazeau (pvalue <0,05) (Tableau 6).

Le test de Mantel sur les 51 individus génotypés avec les 3 marqueurs se traduit par une régression linéaire (Figure 10) et suggère que les distances génétiques sont positivement corrélées aux distances géographiques. Bien que le coefficient de corrélation soit faible, il est significatif (pvalue <0,05) ce qui laisse supposer que la distance structure les populations génétiquement.

II.4. Structuration des populations

Les analyses effectuées par InStruct (Gao et al., 2007), selon la méthode d'Evanno et al. (2005), présentent un pic de delta K (ΔK= 3,26) à K=2 (Figure 11). Ceci suggère qu'il y a 2 groupes génétiques qui structurent les données. Au seuil d'assignation de 90% des individus, vingt-cinq individus appartiennent au cluster 1 tandis que 26 appartiennent au cluster 2 (Annexe 5). Les populations de Birloton, de Carbet, de Duportail, d'Habituée et de Jules se regroupent dans le cluster 1. Quant au cluster 2, il regroupe les populations de Moreau. Les populations de Sofaia, de Desbordes, de Léon, de Mazeau et de Rivière Saint-Louis sont en « admixture » des 2 clusters.

DISCUSSION

I. Régime de reproduction de *V. mexicana*

Selon les résultats des analyses écologiques, le taux d'autofécondation spontanée (53,9%) n'est pas significativement différent du taux de fructification naturelle observée (53,7%) pour l'espèce *V. mexicana* et expliquerait la totalité de celui-ci. Ainsi, cette espèce semble être autogame, capable d'autopollinisation spontanée, tout comme quelques autres espèces du genre (Gigant et al., 2011). Ces espèces sont *V. palmarum, V. savannarum, V. bicolor* (du sous-genre *Xanata*, groupe *V. plamarum*) et *V. guianensis, V. martinezii* (du sous-genre *Vanilla*, groupe *V. mexicana*) (Soto Arenas et Cribbs, 2010 ; figure 3), ce qui suggère que la capacité d'autofertilité spontanée serait un caractère ancestral dans le genre *Vanilla* (Figure 3) qui a été perdu chez les espèces les plus récentes. Le fort taux de fructification naturel calculé chez *V. mexicana* est en accord avec le taux moyen de fructification des espèces autogames du genre *Vanilla* (70,2%), de 53.0% pour *V. martinezii* à 78.0% pour *V. guianensis* (Gigant et al., 2011). Il correspond également aux données relevées chez les orchidées tropicales montrant un taux de moins de 20,0% pour les espèces allogames et un taux autour de 77,0% pour les espèces autogames (Tremblay et al., 2005). Les vanilliers autogames ont aussi la particularité d'être incapable de faire de la reproduction végétative (Soto Arenas, 2006 ; Bory et al., 2008c ; Householder et al, 2010 ; Pignal, 1994 ; Bory et al., 2010 ; Cameron, 2010; Soto Arenas et Dressler, 2010) ce qui est confirmé dans le cas de *V. mexicana* par l'impossibilité de bouturer cette espèce (Feldmann P., com. pers.).

Cependant, l'étude du régime de reproduction de *V. mexicana* reste complexe. D'une part, selon nos analyses sur les populations de Guadeloupe, cette espèce est autogame et capable d'autofécondation spontanée. Ce fait avait déjà été suggéré par certains auteurs (Cameron, 2010 ; Soto Arenas et Dressler 2010). Soto Arenas et Dressler (2010) mentionnent en effet que les planteurs de vanille au Mexique pensent que cette espèce peut être autogame car ils observent de très fort fruit-sets dans certaines populations, toutefois certaines populations ont des fruit-sets très bas (2,5%). *V. mexicana* semble aussi présenter des pollinisateurs potentiels comme des abeilles charpentières *Xylocopa* sp. au Mexique (Soto Arenas et Cameron, 2003). Bien que cette hypothèse n'a pas été prouvée, des espèces de *Xylocopa* sp. ont été observées au Mexique visitant *V. mexicana* (Soto Arenas et Cameron, 2003 ; Soto Arenas et Dressler, 2010) et ces auteurs suggèrent également que *V. mexicana* présente une structure de labelle (frontalement fermé) similaire au labelle des espèces d'orchidées pollinisées par des abeilles charpentières (Soto Arenas et Cameron, 2003).

Ainsi, le régime de reproduction de *V. mexicana* pourrait varier selon sa répartition géographique (Figure 1). L'autogamie caractérisée chez cette espèce serait alors une spécificité des populations de l'île de la Guadeloupe suite à une adaptation à son environnement. Cette évolution vers l'autogamie aurait lieu lorsque les conditions pour une reproduction croisée ne sont pas favorables (absence ou peu de pollinisateurs ou de partenaires pour la reproduction) (Tremblay et al., 2005). Dans ces cas, être capable d'autofécondation spontanée devient un avantage sélectif pour les individus ayant développé ce mode de reproduction (Micheneau et al, 2008). L'autogamie pourrait supplanter l'allogamie (si le caractère est héréditaire) puisque la production de graines et de descendants (Spencer, 2013) devrait être plus importante pour les individus autogames que pour les individus allogames. Dans le cas d'une colonisation dans les îles, de fortes contraintes de reproduction (rareté ou absence de la faune pollinisatrice appropriée) peuvent créer des difficultés pour l'établissement d'une espèce. Dans de telles situations, les espèces qui sont autocompatibles ou capables de se reproduire de façon autonome par autopollinisation seront favorisées sur les îles isolées (Baker, 1955, 1967 ; Stebbins, 1970, Micheneau et al. 2008). Une telle évolution du système de reproduction est constatée chez *Eichhornia paniculata* (Spreng.) *Solms* (Pontederiaceae). Cette espèce est fortement allogame dans les populations de Brésil tandis que dans les populations des îles des Caraïbes, elle est fortement autogame (Spencer, 2013). Chez les Orchidées, il est également rapporté une variation du régime de reproduction selon que l'espèce est continentale ou insulaire. L'autogamie serait prédominante en milieu insulaire dans les habitats où l'activité des pollinisateurs est imprévisible (Tremblay et al., 2005). Chez les Angraecoideae (Vandeae, Orchidaceae) de la Réunion, 15 à 20% seraient autogames (Jacquemyn et al., 2005; Micheneau, 2005; Micheneau et al., 2008). Les Angraecoideae de la Réunion étant considérées comme issues d'une colonisation de l'île par des espèces malgaches, l'absence ou la rareté des pollinisateurs appropriés auraient poussé ces espèces à évoluer vers l'autogamie pour leur reproduction (Micheneau et al., 2008).

Pour pouvoir vérifier nos hypothèses sur *V. mexicana* en Guadeloupe, des études complémentaires de la biologie de la reproduction dans d'autres populations de la région, notamment au Mexique sont nécessaires afin de mieux comprendre la stratégie de reproduction de l'espèce à une échelle globale.

II. Marqueurs microsatellites

Sur les 14 marqueurs microsatellites développés à partir de *V. planifolia* et les 19 marqueurs de *V. humblotii* et *V. roscheri*, aucun marqueur de *V. planifolia* n'est transférable à *V. mexicana* et seulement 6 de *V. humblotii* et *V. roscheri* ont été sélectionnées pour l'amplification d'ADN de *V. mexicana* : HU03, HU04, HU06, HU07, HU09 et RO05. Les microsatellites (ou SSR : Simple Sequence Repeats) sont des répétitions en tandem de motifs d'ADN composées de 1 à 6 paires de bases présentes chez tous les organismes vivants (Durand, 2009). Les microsatellites utilisés au cours des analyses ont été développés à partir de séquences provenant du génome entier et sont surtout situés dans les régions non-codantes. Ils font partis des microsatellites génomiques qui ont la particularité d'être très polymorphes (plus de 50% en général selon les espèces) mais généralement seulement transférables aux espèces proches (Varshney et al., 2005, Sharma et al., 2007). C'est le cas par exemple des 14 marqueurs développés chez *Syderoxylon majus* (Sapotaceae) qui ne sont transférables qu'à 4 espèces proches génétiquement parmi les 14 espèces testées (Dafreville et al., 2011). Une bonne transférabilité des microsatellites développés chez *V. planifolia* et chez *V. humblotii* et *V. roscheri* avait été révélée respectivement sur 17 et 7 espèces (Bory et al., 2008d ; Gigant et al., 2011b). Toutefois les espèces testées appartenaient toutes au même sous-genre, le sous genre *Xanata* (Soto Arenas et Dressler, 2010 ; figure 3). La transférabilité de ces marqueurs semble donc beaucoup moins efficace quand les espèces, telles que *V. mexicana* appartiennent au second sous-genre du genre *Vanilla*, le sous genre *Vanilla* (Figure 3). La divergence phylogénétique entre les deux sous-genres s'est révélée trop importante pour permettre une bonne transférabilité de tous les marqueurs microsatellites employés. Malgré l'amplificabilité des 6 marqueurs, seulement 4 d'entre eux sont polymorphes à l'échelle de la Guadeloupe, ce qui est insuffisant pour faire une étude approfondie des populations. Il est donc nécessaire, afin de poursuivre la caractérisation génétique des populations *V. mexicana* en Guadeloupe, de développer de nouveaux marqueurs microsatellites à partir des individus de Guadeloupe.

En intégrant les 2 accessions de *V. mexicana* provenant du Mexique et de la Martinique, les 6 marqueurs sélectionnés pour les analyses se sont avérés polymorphes avec 22 allèles révélés dont 4 allèles privés au Mexique. Ainsi, élargir l'étude à l'échelle de la région augmente le nombre de marqueurs SSR polymorphes pour cette espèce. Des observations similaires ont été obtenues pour *V. roscheri* près du lac Sibaya (Afrique du Sud). Sur les 16 marqueurs transférables à cette espèce, la totalité était monomorphe et homozygote en Afrique du Sud mais en intégrant un individu de Zanzibar (Tanzanie), 11 des 16 marqueurs devenaient polymorphes dont 7 hétérozygotes (Gigant et al, 2014).

Tout comme pour *V. roscheri* en Afrique du Sud, il est possible que le fort taux d'homozygotie observée en Guadeloupe soit lié à la situation géographique des populations. En effet, d'un point de vue de la distribution de l'espèce (Figure 1), les populations de la Guadeloupe sont isolées des populations continentales du fait de l'insularité ce qui place ces populations en limite d'aire de distribution de l'espèce. Or les espèces présentent une diversité génétique moindre en limite d'aire de distribution (Van der Merwe et al., 2010; Beatty et al., 2008; Silvertown, 2008; Johannesson et André, 2006).

III. Faible taux d'hétérozygotie en Guadeloupe

D'après l'analyse globale des Fis pour toutes les populations et tous les loci, les populations de *V. mexicana* de la Guadeloupe ne sont pas en adéquation avec le modèle de l'équilibre de Hardy Weinberg qui est dû à un déficit en hétérozygotes. Ce déficit en hétérozygotes est la marque des régimes autogames, qui par ailleurs a été révélée pour les populations guadeloupéennes de *V. mexicana*. Il est à noter qu'avec les mêmes marqueurs, le cas contraire est révélé chez une espèce de Mayotte, *V. humblotii* est allogame et les populations sont à l'équilibre de Hardy Weinberg (Gigant, 2012).

Les stratégies de reproduction de l'espèce permettent d'expliquer les résultats des analyses génétiques mais le faible taux d'hétérozygotie en Guadeloupe pourrait également être expliqué par d'autres facteurs comme une fragmentation des populations qui réduirait les flux génétiques inter populationnels (Templeton et al.1990 ; Young et al. 1996, Aguilar et al., 2008). Le nombre limité de marqueurs utilisés pourrait aussi sous-estimer le taux d'hétérozygotie en Guadeloupe. Dans tous les cas, comme attendu pour une espèce autogame, la diversité intra populationnelle (estimée par He) est plus faible que pour les espèces allogames (Nybom 2004). Ainsi la valeur de He obtenue pour *V. mexicana* (0,25) en Guadeloupe est inférieure à celle obtenue (0,33) pour les mêmes marqueurs dans le cas de *V. humblotii* à Mayotte, allogame (Gigant, 2012).

IV. Différenciation et structuration génétiques des populations de *V. mexicana* en Guadeloupe

Comme les calculs de Fst reposent sur les fréquences alléliques, seuls les calculs sur les grandes populations sont considérés dans nos analyses (N>5). Pour les populations à fort effectif, il semble y avoir une bonne différenciation génétique entre Mazeau, et Moreau mais non significative entre Moreau et Sofaia. En AFC, ces 3 populations sont également bien séparées. La stratégie de reproduction de *V. mexicana* corrobore aussi cette différenciation génétique des populations. L'autogamie, limitant le flux de gènes inter populationnel, génère des populations plus fortement subdivisées qu'en allogamie (Nybom, 2004).

Ce flux de gènes est en effet limité par rapport aux espèces allogames car il est assuré seulement par la dispersion des graines (Ronfort et al., 2005). Une méta-analyse comprenant près de 307 études sur les plantes (Nybom, 2004) explique que chez les autogames la diversité génétique est plus importante au niveau inter population en se basant sur une valeur moyenne de Fst supérieure (Fst=0,42) à celle des allogames (Fst=0,22). Quant à la diversité génétique chez les allogames, elle est plutôt intra populationnelle avec une valeur moyenne de He (He=0,65) supérieure à celle des autogames (He=0,41). Nos analyses écologiques et génétiques de *V. mexicana* en Guadeloupe sont en accord avec cette méta-analyse car en comparant nos résultats (Fst=0,15 et He=0,25) à ceux de *V. humblotii* (Gigant, 2012), allogame à Mayotte (Fst=0,12 et He=0,33), il semble y avoir une tendance à ce que les populations de *V. humblotii* soient plus variables au niveau intra populationnelle que celles de *V. mexicana*, la diversité inter populationnelle étant aussi légèrement inférieure.

Quand on intègre les données de distribution géographique à la structuration génétique, les regroupements génétiques issus des analyses Instruct ne correspondent pas à la proximité des populations sur la carte (Figure 11). Par exemple, les populations de Mazeau et de Sofaia localisées dans la partie nord de l'île sont proches géographiquement. Bien qu'elles soient en « admixture », la population de Mazeau est principalement assignée au cluster 1 et celle de Sofaia au cluster 2. Nos résultats suggèrent ainsi que la structuration génétique n'est pas liée à la localisation géographique des populations.

L'isolement par la distance est faible bien qu'il soit significatif. La distance influence significativement la structuration génétique mais d'autres facteurs de nature écologique pourraient également y jouer un rôle. Des données écologiques sur les différentes populations sont actuellement récoltées afin de permettre de tester l'éventuelle hypothèse d'un IBE. Cette structuration en 2 groupes génétiques révélée par Instruct pourrait également résulter d'une succession d'évènements de colonisation.

V. Stratégies de conservation de *V. mexicana*

A l'issu des analyses des populations de la Guadeloupe, *V. mexicana* est caractérisée par un fort fruit set naturel (53,9%) et des populations fortement homozygotes (déficit significatif en hétérozygotes), ce qui est en adéquation avec un régime de reproduction autogame.

Enfin, l'ajout d'accessions originaires du Mexique et de la Martinique montre que toute la diversité de l'espèce *V. mexicana* est loin d'être représentée en Guadeloupe.

Dans les milieux insulaires comme la Guadeloupe, les populations peuvent se former par goulot d'étranglement suite à un événement de colonisation des îles à partir de continent qui induit la perte de la diversité génétique des populations. L'évolution de *V. mexicana* en Guadeloupe vers l'autogamie rend également les populations sensibles à une dépression de consanguinité. Cette dépression augmente le taux d'homozygotes dans la population et peut entrainer une baisse significative de la fitness de reproduction de l'espèce (Charlesworth et Charlerworth, 1987 ; Dudash, 1990 ; Falk et Holsinger, 1991 ; Fenster, 1991 ; Johnston, 1992 ; Dole et Ritland, 1993 ; Heschel et Paige, 1995 ; Frankham, 1995, 2005). Comme vu précédemment, les populations de *V. mexicana* pourraient avoir des régimes de reproduction variant en fonction des localisations, ainsi les génotypes présents dans l'île pourraient être uniques suite à l'évolution adaptative de l'espèce en l'absence de son pollinisateur. Et au cours des générations, l'intégrité de la population est menacée par la perte de sa diversité génétique (Lande, 1988).

Bien que les analyses soient limitées par le nombre de marqueurs et d'individus, il semble que les populations de la Guadeloupe soient uniques d'un point de vue régional. Les caractères spécifiques de *V. mexicana* en Guadeloupe et les menaces auxquelles elle est soumise laissent entendre la nécessité de la conserver et font d'elle un modèle d'étude intéressant pour la génétique des populations.

Au vue de nos résultats, les stratégies de conservation de l'espèce reposent sur la conservation de la diversité génétique des populations de la Guadeloupe. Des mesures de conservation ex situ et in situ doivent être mises en place. La conservation ex situ consisterait à faire une collection d'un maximum de génotypes rencontrés en Guadeloupe en s'assurant qu'il soit le plus représentatif de la diversité. Cette collection ex situ permettra d'avoir du matériel génétiquement complet et disponible pour les activités de recherche et de conservation sur le long terme. Etant donné que l'espèce ne se bouture pas, la collection ex situ nécessiterait la collecte de graines et la mise en germination de semis pour le suivi des descendants. Quant à la conservation in situ de *V. mexicana*, elle est déjà assurée par la répartition de la plupart des populations dans les limites du parc national. Ainsi, une mesure supplémentaire serait la réintroduction d'individus dans les populations aux faibles effectifs telles que Jules, Birloton, Carbet et Duportail en tenant compte de leur appartenance au cluster génétique afin d'éviter une « outbreeding depression ».

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les banques de marqueurs microsatellites obtenue à partir de *V. planifolia, V. humblotii et V. roscheri* ont permis de sélectionner 6 marqueurs qui ont été utilisés pour l'analyse dans cette étude. Ces marqueurs présentent un polymorphisme au niveau de la région Guadeloupe- Martinique-Mexique et 4 de ces 6 au niveau de la Guadeloupe.

Au sein des populations de la Guadeloupe, le taux d'autofécondation spontanée de 53,9% explique la totalité du taux de fructification naturelle observée (53,7%) pour l'espèce *V. mexicana*. En Guadeloupe, cette espèce a un régime de reproduction autogame et est capable d'autopollinisation spontanée. Sa particularité réside aussi dans le fait qu'elle est incapable de faire de la reproduction végétative. La forte homozygotie des populations guadeloupéennes est due à sa stratégie de reproduction. L'autogamie est aussi une des principales causes de la différenciation génétique des populations de la Guadeloupe. La diversité génétique des populations est plus importante au niveau inter population qu'au niveau intra population du fait de cette autogamie. Quand les données géographiques sont insérées dans les analyses, les populations ne présentent pas de structuration génétique liée à la localisation géographique, toutefois un pattern d'IBD significatif, mais faible (isolement par la distance) est détecté. La structuration des populations pourrait être mieux expliquée par un phénomène d'isolement par l'écologie (IBE) ou par plusieurs événements de colonisation ce qui reste à vérifier.

Néanmoins, les analyses effectuées sont très dépendantes de l'effectif des populations, du nombre de marqueurs microsatellites utilisés, des problèmes techniques et des erreurs de génotypage. Ainsi, il est nécessaire de faire des études complémentaires pour confirmer nos résultats. Pour cela, les perspectives seraient de mettre en place des banques de marqueurs microsatellites développés à partir de *V. mexicana* pour faire une analyse en génétique des populations plus poussée et complète, augmenter le nombre d'individus échantillonnés pour bien représenter chaque population, étendre l'échantillonnage à l'échelle régionale et faire une étude sur les éventuels pollinisateurs de cette espèce à l'échelle régionale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herrerias- Diego, Y., Lobo, J., 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. Molecular Ecology, 17. 24, 5177-5188.

Alemayehu, K., Dessie, T., Mekasha, Y., 2011. Effects of habitat loss and limitation on effective population size and inbreeding rates of Walia ibex (*Capra walie*) in Ethiopia. African Journal of Ecology.

Allendorf, F. W., Luikart, G. H., Aitken, S. N., 2012. Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons.

Allphin, L., Windham , M. D., Harper, K.T.,1998. Genetic diversity and gene flow in the endangered dwarf bear poppy, Arctomecon humilis (Papaveraceae). Am J Bot 85. 9,1251.

Baker, H. G., 1959. Reproductive methods as factors in speciation in flowering plants. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 24,177–190.

Baker, H. G., 1963. Evolutionary mechanisms in pollination biology. Science. 139,877–883.

Baker, H. G., 1970. Evolution in the tropics. Biotropica. 2,101–111.

Barrett, S. C., Kohn, J. R., Falk, D. A., Holsinger, K. E., 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Genetics and conservation of rare plants. pp. 3-30.

Barrett, S. C., Kohn, J. R., Falk, D. A., Holsinger, K. E., 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Genetics and conservation of rare plants.., 3-30.

Beatty, G.E., McEvoy, P.M., Sweeney, O., Provan, J., 2008. Range-edge effects promote clonal growth in peripheral populations of the one-sided wintergreen Orthilia secunda. Diversity and Distributions 14 (3):546-555.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., 2004. Université de Montpellier II; Montpellier, France: 1996–2004. Genetix 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations. Interactions, CNRS UMR 5171.

Besse, P., 2008. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Genome. 51, 816-826.

Bory, S., Catrice, O., Brown, S., Leitch, I.J., Gigant, R., Chiroleu, F., Grisoni, M., Duval, M.F., Besse, P., 2008. Natural polyploidy in *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). Genome. 51, 816-826.

Bory, S., Grisoni, M., Duval, M. F., Besse, P., 2008b. Biodiversity and preservation of *Vanilla*: present state of knowledge. Genet Resour Crop Ev. 55, 551-571.

Bory, S., Lubinsky, P., Risterucci, A. M., Noyer, J. L., Grisoni, M., Duval, M. F., Besse, P., 2008c. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). Am J Bot 95. 7, 805-815.

Bory, S., Da Silva, D., Risterucci, A. M., Grisoni, M., Besse, P., Duval, M. F., 2008d. Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other vanilla species. Scientia Horticulturae, 115(4), 420-425.

Bory, S., Brown, S., Duval, M. F., Besse, P., 2010. Evolutionary Processes and Diversification in the Genus *Vanilla*, In *Vanilla*. eds E. Odoux, M. Grisoni, Taylor and Francis Group, pp. 15-28.

Bouetard, A., Lefeuvre, P., Gigant, R., Bory, S., Pignal, M., Besse, P., Grisoni, M., 2010. Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. Mol Phylogenet Evol. 55, 621-630.

Burgman, M. A., Neet, C. R., 1989. Analyse des risques d'extinction des populations naturelles. Acta Oecol (Oecol Genet). 10, 233-43.

Cameron, K.M., 2004. Utility of plastid psaB gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. Mol Phylogenet Evol 31. 3, 1157-1180.

Cameron, K. M., 2005. Recent Advances in the Systematic Biology of *Vanilla* and Related Orchids (Orchidaceae: subfamily Vanilloideae). In: First International Congress, Princeton, NJ, USA, 11-12 November 2003, pp. 89-93.

Cameron, K.M., 2010. Vanilloid orchids. In: *Vanilla*, eds E. Odoux, M. Grisoni. CRC Press Taylor and Francis Group.

Charlesworth, D., Charlesworth, B., 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Annual review of ecology and systematics, pp. 237-268.

Childers, N. F., Cibes, H. R., 1948. *Vanilla* culture in Puerto Rico. US Government Printing Office.

Cook, R.E., 1983. Clonal plant populations. American Scientist. 71, 244-253.

Dafreville, S., Payet, G., Simiand, C., Risterucci, A.M., Rivière, E., Lebreton, G., Humeau, H., Strasberg, D., Chevallier, M.H., 2011. Isolation and characterization of microsatellite markers of an endangered tropical tree, *Sideroxylon majus*, and cross-species amplification in other Sapotaceae species In Conservation genetics. Springer US.

Development Team, 2012. Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. Free Software Foundation, India.

Dole, J., Ritland, K., 1993. Inbreeding depression in two Mimulus taxa measured by multigenerational changes in the inbreeding coefficient. Evolution, pp. 361-373.

Dudash, M. R., 1990. Relative fitness of selfed and outcrossed progeny in a self-compatible, protandrous species, *Sabatia angularis* L. (Gentianaceae): a comparison in three environments. Evolution, pp. 1129-1139.

Durand, G., 2009. Contribution à la cartographie génétique chez les Fagacées. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1 Ecole doctorale des sciences et environnement, Bordeaux 1, France, pp. 209.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14 (8):2611-2620.

Ezard, T. H. G., Travis, J. M. J., 2006. The impact of habitat loss and fragmentation on genetic drift and fixation time. Oikos, 114. 2, 367-375.

Faegri, K., Van der Pijl, L., 1966. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford.

Fahrig, L., 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual review of ecology, evolution, and systematics, pp. 487-515.

Feldmann, P., 2012. An updated catalogue of Lesser Antilles Orchids and of their distribution. L'Orchidophile. 193, 109-127.

Fenster, C. B., 1991. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. Gene dispersal. Evolution, pp. 398-409.

Fournet, J., 2002. Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique. Nouvelle édition revue et augmentée. CIRAD, Montpellier - Gondwana Editions, La Trinité, pp. 2538.

Frankel, O. H., Soule, M. E., 1981. Conservation and evolution.

Frankham, R., 1995. Conservation genetics. Annu Rev Genet 29. 1, 305-327.

Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. Biol Conserv 126. 2, 131-140.

Frankham, R., 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. Biological conservation, 143. 9, 1919-1927.

Futuyma, D. J., 1998. Evolutionary Biology. Sinauer. Sunderland.

Gao, H., Williamson, S., Bustamante, C.D., 2007. A Markov Chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. Genetics 176: 1635–1651. doi: 10.1534/genetics.107.072371

Gigant, R., Bory, S., Grisoni, M., Besse, P., 2011. Biodiversity and Evolution in the *Vanilla* Genus, In The Dynamical Processes Of Biodiversity; Cases Studies Of Evolution And Spatial Distribution. eds O. Grillo, G. Venora. Intech, Rijeka, Croatia, pp. 366.

Gigant, R., Brugel, A., De Bruyn, A., Risterucci, A. M., Guiot, V., Viscardi, G., Humeau, L., Grisoni, M., Besse, P., 2011b. Nineteen polymorphic microsatellite markers from two African Vanilla species: across-species transferability and diversity in a wild population of *V. humblotii* from Mayotte. Conservation Genetics Resources, 4(1), 121-125.

Gigant, R., 2012. Biologie de la reproduction, diversité génétique et spatiale de deux espèces du genre *Vanilla* (Orchidaceae) du sud-ouest de l'océan Indien: *V. humblotii* et *V. roscheri*. Implications pour leur conservation. Thèse de doctorat. Université de la Réunion, Saint-Denis, Ile de La Réunion, France, pp. 203.

Gigant, R., De Bruyn, A., Church, B., Humeau, L., Gauvin-Bialecki, A., Pailler, T., Grisoni, M., Besse, P., 2014. Active sexual reproduction but no sign of genetic diversity in range-edge populations of *Vanilla roscheri* Rchb. f. (Orchidaceae) in South Africa. Conservation Genetics, 15. 6, 1403-1415.

Gitzendanner, M. A., Weekley, C. W., Germain-Aubrey, C. C., Soltis, D. E., Soltis, P. S., 2012. Microsatellite evidence for high clonality and limited genetic diversity in *Ziziphus celata* (Rhamnaceae), an endangered, self-incompatible shrub endemic to the Lake Wales Ridge, Florida, USA. Conservation Genetics, 13. 1, 223-234.

Goulié, C., 2014. Répartition et écologie de *Vanilla mexicana* en Guadeloupe. Implication du prestataire. Rapport de stage de master 1 EcoTrop. Université des Antilles et de la Guyane.

Guo, S.W, Thompson, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics:361-372.

Halkett, F., Simon, J-C., Balloux, F., 2005. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. Trends in Ecology & Evolution 20. 4, 194-201.

Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In Conservation genetics. Springer US, pp. 281-304.

Heschel, M. S., Paige, K. N., 1995. Inbreeding depression, environmental stress, and population size variation in scarlet gilia (*Ipomopsis aggregata*). Conservation Biology, 9. 1, 126-133.

Householder, E., Janovec, J., Balarezo Mozambite, A., Huinga Maceda, J., Wells, J., Valega, R., 2010. Diversity, natural history, and conservation of *Vanilla* (Orchidaceae) in amazonian wetlands of Madre De Dios, Peru. J. Bot. Res. Inst. Texas, Vol. 4, pp. 227 - 243.

Hutchison, D., Templeton, A. R., 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. Evolution. 53, 1898–1914.

Jacquemyn, H., Micheneau, C., Roberts, D.L., Pailler, T., 2005. Elevation gradients of species diversity, breeding system and floral traits of orchid species on Re ´union Island. J. Biogeogr. 32, 1751–1761.

Jenkins, D. G., Carey, M., Czerniewska, J., Fletcher, J., Hether, T., Jones, A.,Tursi, R., 2010. A meta-analysis of isolation by distance: relic or reference standard for landscape genetics. Ecography, 33. 2, 315-320.

Johannesson, K., André, C., 2006. INVITED REVIEW: Life on the margin: genetic isolation and diversity loss in a peripheral marine ecosystem, the Baltic Sea. Mol Ecol 15 (8):2013-2029.

Johansson, D., 1974. Ecology of vascular epiphytes in West African rain forest.

Johnston, M. O., 1992. Effects of cross and self-fertilization on progeny fitness in *Lobelia cardinalis* and *L. siphilitica*. Evolution, pp. 688-702.

Klimes, L., Klimesova, J., Hendriks, R., Van Groenendael, J., 1997. Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In The Ecology and Evolution of Clonal Plants, ed. H de Kroon, J van Groenendael, Leiden: Backhuys, pp. 1–29.

Lande, R., 1988. Genetics and demography in biological conservation. Science (Washington), 241(4872), pp. 1455-1460.

Leblois, R., Estoup, A., Streiff, R., 2006. Genetics of recent habitat contraction and reduction in population size: does isolation by distance matter? Molecular Ecology, 15. 12, 3601-3615.

Les, D.H., Reinhartz, J.A., Esselman, E.J., 1991. Genetic consequences of rarity in *Aster furcatus* (Asteraceae), a threatened, selfincompatible plant. Evolution. 45, 1641–1650.

Levin, D. A., Kerster, H. W., 1974. Gene flow in seed plants. In Evolutionary biology. Springer US, pp 139 220.

Macedo Reis, C.A., 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, Piracicaba, SP - Brasil.

Mallet, B., 2014. Rôle des facteurs écologiques dans le processus de spéciation en milieu insulaire. Effet de l'habitat et des pollinisateurs sur la diversification du faham (*Jumellea spp*., Orchidaceae) aux Mascareignes. Thèse de doctorat. Université de la Réunion, Saint-Denis, Ile de La Réunion, France. pp. 207.

Mallet, B., Martos, F., Blambert, L., Pailler, T., Humeau, L., 2014b. Evidence for isolation-by-habitat among populations of an epiphytic orchid species on a small oceanic island (D Canestrelli, Ed,). PLos One, 9, e87469.

McGarigal, K., Cushman, S. A., 2002. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. Ecological applications, 12. 2, 335-345.

Micheneau, C., 2005. Systématique moléculaire de la sous-tribu des Angraecinae: perspectives taxonomiques et implications de la relation plantes-pollinisateurs dans l'évolution des formes florales. Thèse de doctorat. Université de La Réunion, Saint Denis.

Micheneau, C., Carlsward, B.S., Fay M.F., Bytebier, B., Pailler, T., Chase, M.W., 2008. Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandeae, Orchidaceae). eds Elsevier, In Molecular Phylogenetics and Evolution 46, 908–922.

Nielsen, L. R., 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. 3, 285-302.

Nybom, 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology 13, 1143–1155.

Ouborg, N. J., Vergeer, P., Mix, C., 2006. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. Journal of Ecology, 94. 6, 1233-1248.

Pansarin, E.R., 2010. *Vanilla diestchiana*, an endangered species native to Brazil. Orchids.

Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 228-295.

Pegueroles, C., Aquadro, C. F., Mestres, F., Pascual, M., 2013. Gene flow and gene flux shape evolutionary patterns of variation in *Drosophila subobscura*. Heredity, 110. 6, 520-529.

Pignal, M., 1994. Deux vanilles du Brésil : *Vanilla palmarum* Lindley et *Vanilla bahiana* Hoehne. L'Orchidophile, Vol.110, pp. 23-25.

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

Pray, L. A., Schwartz, J. M., Goodnight, C. J., Stevens, L., 1994. Environmental dependency of inbreeding depression: implications for conservation biology. Conservation Biology, 8.2, 562-568.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155 (2):945.

Puig, H., 2001. Diversité spécifique et déforestation: l’exemple des forêts tropicales humides du Mexique. Bois et Forêts des tropiques, 268. 2, 41-55.

R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/.

Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86, 248-249.

Richman, A.D., Kohn, J.R., 1996. Learning from rejection: the evolutionary biology of single locus incompatibility. Trends in Ecology and Evolution. 11, 497–502.

Rolfe, R.A., 1896. A revision of the genus *Vanilla*. Journal of the Linnean Society, Vol.32, pp. 439-478.

Ronfort, J., Jenczewski, E., Muller, M., 2005. Les flux de gènes et leur impact sur la structure de la diversité génétique. Le cas des prairies: Génétique et prairies. Fourrages (Versailles). 182, 275-286.

Rosenberg, N. A., 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Notes 4: 137-138.

Sastre, C., Jouy, A., 2001. Vulnérabilité des orchidées des forêts tropicales, particulièrement en Amérique, Guadeloupe et Martinique. Revue forestière française. 53, 98-104.

Shafer, A., Wolf, J. B., 2013. Widespread evidence for incipient ecological speciation: a meta-analysis of isolation-by-ecology. Ecology letters, 16. 7, 940-950.

Silvertown, J., 2008. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. Int J Plant Sci 169 (1):157-168.

Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 236. 4803, 787 792.

Soto Arenas, M.A., 1999. Filogeografia y recursos genéticos de las vainillas de México, Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología, México, pp. 102.

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

Soto Arenas, M.A., 2006. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. Biodiversitas, Vol.66, pp. 2-9.

Soto Arenas, M.A., Cribb, P., 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex Mill. (Orchidaceae: Vanillinae). Lankesteriana, Vol.9, pp. 355- 398.

Soto Arenas, M.A., Dressler, R.L., 2010. A revision of the mexican and central american species of *Vanilla* Plumier ex. Miller with a acharacterization of their ITS region of the nulcear ribosomal DNA. Lankesteriana, Vol.9, pp. 285-354.

Spencer, C.H.B., 2013. Evolution of mating systems : Outcrossing versus Selfing. In *The Princeton Guide to Evolution* ed. J. Losos. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp. 356- 362.

Swarts, N. D., Sinclair, E. A., Krauss, S. L., Dixon, K. W., 2009. Genetic diversity in fragmented populations of the critically endangered spider orchid *Caladenia huegelii*: implications for conservation. Conservation genetics, 10. 5, 1199-1208.

Templeton, A.R., Shaw, K., Routman, E., Davis, S.K., 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. Annals of the Missouri Botanical Garden, pp. 13-27.

Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K., Calvo, R.N., 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. Biol. J. Linn. Soc., Vol.84, pp. 1–54.

Vallejo-Marín, M., Dorken, M. E., Barrett, S. C., 2010. The ecological and evolutionary consequences of clonality for plant mating. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 41. 1, 193.

Van Dam, A.R., Householder, J.E., Lubinsky, P., 2010. *Vanilla bicolor* Lindl. (Orchidaceae) from the Peruvian Amazon: auto-fertilization in Vanilla and notes on floral phenology. Genet Resour Crop Evol, Vol.57, pp. 473-480.

Van der Merwe, M., Spain, C.S., Rossetto, M., 2010. Enhancing the survival and expansion potential of a founder population through clonality. New Phytol 188 (3):868-878.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4, 535-538.

Varshney, R. K., Graner, A., Sorrells, M. E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. TRENDS in Biotechnology, 23(1), 48-55.

Vrijenhoek, R.C., 1994. Genetic diversity and fitness in small populations. In: Loeschcke, V., Tomiuk, J., Jain, S.K. (Eds.), Conservation Genetics. Birkha¨user Verlag, Basel, Switzerland, pp. 37–53.

Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38, 1358-1370.

Weiss, E.A., 2002. Chapter 7: Orchidaceae. In: Spice Crops. CABI publishing, Wallington, UK pp. 136-154.

Wright, S., 1943. Isolation by distance. Genetics, 28. 2, 114.

Young, A., Boyle, T., Brown, T., 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Tree 11. 10, 413-418.

Young, A.G., Brown, A.H.D., Murray, B.G., Thrall, P.H., Miller,C.H., 2000. Genetic erosion, restricted mating and reduced viability in fragmented populations of the endangered grassland herb *Rutidosis leptorrhynchoides*. In: Young, A.G., Clarke, G.M. (Eds.), Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 335–359.

ANNEXE

Annexe 1 : Coordonnées géographiques des individus de *V. mexicana* échantillonnés en Guadeloupe

Numéro	Population	Latitude	Longitude	Altitude
CR2333	Birlo	16,14754029	-61,74783654	509
CR2207	Carbe	16,02728389	-61,633982	414
CR2261	Carbe	16,03289434	-61,6392989	576
CR2262	Carbe	16,03755988	-61,64100562	600
CR2263	Carbe	16,03814392	-61,64188955	597
CR2264	Carbe	16,03134105	-61,63381413	531
CR2244	Desbo	16,15690677	-61,64484183	238
CR2245	Desbo	16,15629435	-61,64518265	250
CR2246	Desbo	16,15488819	-61,64720281	262
CR2247	Desbo	16,15572477	-61,65085362	264
CR2248	Desbo	16,15439742	-61,65248042	306
CR2249	Desbo	16,15453539	-61,65429373	258
CR2250	Desbo	16,15454398	-61,65852058	305
CR2251	Desbo	16,15358446	-61,65972405	303
CR2252	Desbo	16,15285879	-61,66074826	294
CR2253	Desbo	16,15371246	-61,66139713	285
CR2258	Dupor	16,22939038	-61,70675582	233
CR2208	Habit	16,26698096	-61,7231845	298
CR2209	Habit	16,26659887	-61,72427239	308
CR2210	Habit	16,26659887	-61,72427239	308
CR2211	Habit	16,26659887	-61,72427239	308
CR2212	Habit	16,26650097	-61,72452567	305
CR2213	Habit	16,26610465	-61,72475279	308
CR2214	Habit	16,26610465	-61,72475279	308
CR2215	Habit	16,26585288	-61,72496963	304
CR2216	Habit	16,26585288	-61,72496963	304
CR2217	Habit	16,26586304	-61,72515671	305
CR2218	Habit	16,26587299	-61,72530635	316
CR2219	Habit	16,26587299	-61,72530635	316
CR2220	Habit	16,26587299	-61,72530635	316
CR2221	Habit	16,26587299	-61,72530635	316
CR2222	Habit	16,26576509	-61,72540062	313
CR2223	Habit	16,26568426	-61,72548535	311
CR2224	Habit	16,26568426	-61,72548535	311
CR2225	Habit	16,2656046	-61,72576658	313
CR2226	Habit	16,2656046	-61,72576658	313
CR2227	Habit	16,2656046	-61,72576658	313
CR2228	Habit	16,2656046	-61,72576658	313
CR2229	Habit	16,26541481	-61,7257678	315

CR2230	Habit	16,26516299	-61,72597527	330
CR2231	Habit	16,26516299	-61,72597527	330
CR2232	Habit	16,26469774	-61,72676426	339
CR2233	Habit	16,26469774	-61,72676426	339
CR2234	Habit	16,26469774	-61,72676426	339
CR2235	Habit	16,26469774	-61,72676426	339
CR2236	Habit	16,26466186	-61,72681128	329
CR2237	Habit	16,26417551	-61,72709511	356
CR2238	Habit	16,26417551	-61,72709511	356
CR2239	Habit	16,26353881	-61,72793197	365
CR2240	Habit	16,26353881	-61,72793197	365
CR2203	Jules	16,1975037	-61,67891177	196
CR2204	Jules	16,19754888	-61,67891147	194
CR2205	Jules	16,19381129	-61,68250939	201
CR2206	Jules	16,19399835	-61,68352769	196
CR2241	Jules	16,18254546	-61,68769084	238
CR2242	Jules	16,18380517	-61,68677527	228
CR2243	Jules	16,18380517	-61,68677527	228
CR2257	Jules	16,17282001	-61,70536596	316
CR2302	Léon	16,18357544	-61,75529802	727
CR2303	Léon	16,18347661	-61,75540155	696
CR2304	Léon	16,18366255	-61,75628897	659
CR2305	Léon	16,18369052	-61,75488577	704
CR2306	Léon	16,18363454	-61,7545868	720
CR2265	Mazea	16,28800203	-61,75928341	556
CR2266	Mazea	16,29152634	-61,75916767	553
CR2267	Mazea	16,29152634	-61,75916767	553
CR2268	Mazea	16,28667365	-61,76861251	588
CR2269	Mazea	16,2918401	-61,76645596	513
CR2270	Mazea	16,2918401	-61,76645596	513
CR2271	Mazea	16,29203006	-61,76648285	511
CR2272	Mazea	16,29203006	-61,76648285	511
CR2273	Mazea	16,29256831	-61,76578695	508
CR2274	Mazea	16,29256831	-61,76578695	508
CR2275	Mazea	16,29256831	-61,76578695	508
CR2276	Mazea	16,29256831	-61,76578695	508
CR2277	Mazea	16,29256831	-61,76578695	508
CR2278	Mazea	16,30028862	-61,77381541	429
CR2279	Mazea	16,29993077	-61,77133754	427
CR2280	Mazea	16,29993077	-61,77133754	427
CR2281	Mazea	16,29950986	-61,77045105	457
CR2282	Mazea	16,29950986	-61,77045105	457
CR2283	Mazea	16,29950986	-61,77045105	457
CR2284	Mazea	16,29932437	-61,76963798	474
CR2285	Mazea	16,28744379	-61,77360504	567
CR2307	Morea	16,12053663	-61,62779166	248

CR2308	Morea	16,11979691	-61,6280118	231
CR2309	Morea	16,11817129	-61,62961244	251
CR2310	Morea	16,11618693	-61,63024315	241
CR2311	Morea	16,11540862	-61,63149199	254
CR2312	Morea	16,12291563	-61,62248319	225
CR2313	Morea	16,12397352	-61,62114817	235
CR2314	Morea	16,12414366	-61,6209039	227
CR2315	Morea	16,12414366	-61,6209039	227
CR2316	Morea	16,12414366	-61,6209039	227
CR2317	Morea	16,12414366	-61,6209039	227
CR2318	Morea	16,12414366	-61,6209039	227
CR2319	Morea	16,12471207	-61,62075037	219
CR2320	Morea	16,12521737	-61,6192228	224
CR2321	Morea	16,12464765	-61,61777748	222
CR2322	Morea	16,12286804	-61,62210951	242
CR2323	Morea	16,12396841	-61,62596349	243
CR2324	Morea	16,12343573	-61,62605131	251
CR2325	Morea	16,12728679	-61,61499155	189
CR2326	Morea	16,1285026	-61,61154222	180
CR2327	Morea	16,12731155	-61,63002649	291
CR2328	Morea	16,12710616	-61,63323504	299
CR2329	Morea	16,1333739	-61,61428538	200
CR2254	MURA	16,2842983	-61,72166887	312
CR2255	MURA	16,28224594	-61,72006324	316
CR2256	MURA	16,28508831	-61,71184728	214
CR2259	MURA	16,27385635	-61,71823678	276
CR2260	MURA	16,27385635	-61,71823678	276
CR2330	Riv S	16,05088683	-61,70452045	566
CR2331	Riv S	16,04899356	-61,70382234	536
CR2332	Riv S	16,04908383	-61,70380306	542
CR2286	Sofai	16,2889937	-61,73142712	349
CR2287	Sofai	16,2889937	-61,73142712	349
CR2288	Sofai	16,28425145	-61,736436	429
CR2289	Sofai	16,28430318	-61,73753054	451
CR2290	Sofai	16,28420405	-61,73909395	476
CR2291	Sofai	16,28430441	-61,7377364	463
CR2292	Sofai	16,28319789	-61,73558182	407
CR2293	Sofai	16,28490929	-61,73007778	284
CR2294	Sofai	16,28690452	-61,7312066	343
CR2295	Sofai	16,28689739	-61,73152482	345
CR2296	Sofai	16,28689739	-61,73152482	345
CR2297	Sofai	16,28689739	-61,73152482	345
CR2298	Sofai	16,28784593	-61,73144385	348
CR2299	Sofai	16,28821593	-61,7313479	342
CR2300	Sofai	16,29022224	-61,72980961	334
CR2301	Sofai	16,29022224	-61,72980961	334

Annexe 2 : Protocole détaillé de l'extraction d'ADN de *V. mexicana* selon DNeasy Plant Mini (Qiagen, France)

1- Mixer les tissus de la plante dans un tube 2 ml avec une bille de tungstène par tube en la passant au « TissuLyser » pendant 8 minutes, fréquence=30. Penser à équilibrer les boîtes qui vont être utilisées sur la machine.
2- Ajouter 400 µl de buffer AP1 et 4µl de RNase A dans chaque tube puis vortexer.
3- Incuber à 65°C pendant 10 minutes au bain marie tout en mélangeant 2 à 3 fois pendant l'incubation.
4- Ajouter 130 µl de buffer P3 puis mélanger et incuber dans la glace pendant 5 minutes.
5- Centrifuger à 14 000 rpm (20 000g) pendant 5 minutes à température ambiante.
6- Changer de tube en utilisant les tubes et les colonnes Qiashredder Minispin mauve du kit et déverser le surnageant dans la colonne.
7- Centrifuger à 14 000 rpm (20 000g) pendant 2 minutes à température ambiante.
8- Déverser 1,5 fois le volume total du buffer AW1 dans le tube et mélanger rapidement avec une pipette.
9- Changer à nouveau de tube et utiliser les colonnes DNeasy Minispin blanche du kit. Déverser 650 µl de la solution dans la colonne
10- Centrifuger à 8 000 rpm (6 000g) pendant 1 minute à température ambiante.
11- Jeter la partie filtrée et conserver la colonne. Déverser le reste de solution dans la même colonne et recentrifuger à 8 000 rpm (6 000g) pendant 1 minute à température ambiante.
12- Ajouter 500 µl de buffer AW2. Centrifuger à 8 000 rpm (6 000g) pendant 1 minute à température ambiante
13- Ajouter 500 µl de buffer AW2 et centrifuger à 14 000 rpm (20 000g) pendant 2 minutes à température ambiante.
14- Si la colonne n'est pas totalement propre (blanche), ajouter 500µl d'éthanol absolu dans la colonne et centrifuger à 14 000 rpm (20 000g) pendant 2 minutes à température ambiante.
15- Changer de tubes pour l'élution et ajouter 40 µl de buffer AE dans la colonne et incuber 5 minutes à température ambiante. Ensuite, centrifuger à 8 000 rpm (6 000g) pendant 10 minutes à température ambiante.

16- Ajouter à nouveau 30 µl du tampon d'élution AE dans la colonne, incuber 5 minutes à température ambiante. Ensuite, centrifuger à 8 000 rpm (6 000g) pendant 10 minutes à température ambiante.

Annexe 3 : Protocole détaillé de la purification d'ADN de *V. mexicana* selon GeneClean® TurboKit

1- La quantité d'ADN à purifier est de 30µl. Mettre 30µl de la solution d'ADN dans un tube de 2 ml et ajouter 5 fois le volume de GeneClean Turbo GNomic Salt Solution en tapotant le tube.
2- Transférer 600 µl du mélange dans un tube avec une colonne.
3- Centrifuger à 9230 rpm (14 000 g) pendant 5 secondes, garder la colonne et jeter le contenu du tube. Le tube est réutilisable.
4- Laver avec 500 µl de GeneClean Turbo Wash dans la colonne en centrifugeant à 9230 rpm (14 000 g) pendant 5 secondes. Garder la colonne et jeter le contenu du tube. Le tube est réutilisable.
5- Si le filtre dans la colonne n'est pas propre (blanche), ajouter de l'éthanol absolu et centrifuger comme précédemment.
6- Centrifuger à vide pour éliminer le reste de solution de lavage à 9 230 rpm (14 000 g) pendant 4 minutes.
7- Détacher la colonne et mettre dans de nouveaux tubes
8- Ajouter 20 µl de solution de GeneClean Turbo Elution dans la colonne, incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
9- Centrifuger à 9230 rpm (14 000 g) pendant 1 minute.
10- Ajouter 10 à 20 µl de solution de GeneClean Turbo Elution dans chaque tube en fonction de la quantité de la solution d'ADN de départ. Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
11- Centrifuger à 9 230 rpm (14 000 g) pendant 1 minute, jeter la colonne et garder le contenu du tube qui est l'ADN purifié.

Annexe 4: Protocole détaillé de génotypage microsatellites d'ADN de *V. mexicana*

1- Faire une electrophorèse de vérification du succès de l'amplification PCR sur un gel d'agarose à 2% afin d'estimer la dilution des produits PCR pour le génotypage. Plus une bande est intense, plus l'amplification a réussi et plus le produit est dilué. Ainsi, s'il n'y a pas de bande sur le gel, on ne dilue pas le produit PCR pour la suite des manipulations.
2- Les plaques PCR, les tubes, les nappes et l'eau HPLC utilisés pendant les manipulations sont stérilisées au four à UV.
3- Sur une plaque PCR de 96 puits, diluer les produits PCR en rajoutant la quantité nécessaire à de l'eau HPLC (par exemple une dilution au 1/10ème pour un volume final de 30µl consiste à rajouter 3µl de produit PCR à 27µl d'eau).
4- Ensuite, laisser décongeler un tube de formamide sous la hotte à sorbone (l'ensemble des manipulations se fait sous hotte à sorbone car le formamide est un agent dénaturant de l'ADN et dangereux pour la santé) et une fois décongelé, sortir également le tube de marqueur de taille ou « ladder » *(Gene Scan- 500 Liz Size Standard AB)* du réfrigérateur (il va servir à avoir une échelle de taille en paires de bases pour le génotypage) et le mettre sous la hotte.
5- Puis, préparer le mix formamide-ladder en mélangeant dans un tube de 2ml la quantité nécessaire pour avoir 10,7µl de formamide + 0,3µl de ladder dans chacun des puits d'une plaque PCR. Homogénéiser le mix au vortex.
6- Prélever 11 µl du mix formamide-ladder et le déposer dans chacun des puits ensuite ajouter 1µl du produit PCR ou du produit PCR dilué. Faire en sorte de remplir tous les puits vides dans un run par du mix formamide-ladder même sans produit PCR à analyser.
7- Une fois la plaque de génotypage préparer, la recouvrir de la nappe de couleur gris-clair prévu pour les manipulations suivantes. Centrifuger la plaque de génotypage pendant quelques secondes pour faire descendre tout le produit au fond du puit.
8- Dénaturer le contenu de la plaque de génotypage au thermocycleur pendant 5 minutes à 95°C.
9- Une fois la dénaturation terminée, placer la plaque dans un bac rempli de glace pendant 5 minutes (le choc thermique va maintenir l'ADN en simple brin). Ensuite, remplacer la nappe gris-clair avec la nappe gris-foncé pour avoir les guides pour les capillaires.

10- Mettre la plaque de génotypage dans le support et fermer avec le couvercle prévu à cet effet en respectant le sens approprié de la plaque dans le support.
11- Appuyer sur le bouton « tray » pour ramener le chariot du séquenceur, ouvrir la porte du séquenceur et placer le boitier contenant la plaque sur la place indiquée.
12- Vérifier qu'il y a de l'eau de rinçage, du tampon et que le bac à eau poubelle est bien en place et refermer la porte de l'appareil.
13- Ouvrir le logiciel « *AB applied biosystem 3130XL »*, importer le fichier de génotypage qui servira à affecter les lectures aux individus correspondant, suivre les instructions d'utilisation du sequenceur et lancer l'analyse.
14- Une fois les lectures terminées, visualiser le résultat avec le logiciel *GeneMapper*

Annexe 5: Probabilité postérieure moyenne de l'appartenance des populations dans chacun des 2 clusters avec un seuil de 90%.

Population	Effectif	Cluster 1	Cluster 2
BIRLO	1	0,959	0,041
CARBE	1	0,977	0,023
DESBO	4	0,496	0,504
DUPOR	1	0,977	0,023
HABIT	4	0,973	0,027
JULES	1	0,976	0,024
LEON	2	0,502	0,498
MAZEA	14	0,637	0,363
MOREA	13	0,099	0,901
RIVS	3	0,656	0,344
SOFAI	7	0,296	0,704

RESUME

Vanilla mexicana Mill (Orchidaceae) est une espèce ancestrale de vanillier distribuée en Amérique centrale. En Guadeloupe, l'étude de *V. mexicana* vise, grâce à des marqueurs microsatellites (SSR), à évaluer les niveaux de diversité et de différenciation génétique des populations ainsi que les conséquences des stratégies de reproduction de l'espèce sur la diversité génétique et la structuration des populations. Pour ce faire 6 marqueurs microsatellites développés chez *V. humblotii et V. roscheri* sont sélectionnés et utilisés pour l'analyse de 133 individus (131 en Guadeloupe, 1 en Martinique et 1 au Mexique). Les analyses ont été ensuite basées sur un jeu complet de données avec 51 individus et 3 marqueurs SSR (HU03, HU07, HU09). En Guadeloupe, *V. mexicana* a un régime de reproduction autogame et est capable d'autopollinisation spontanée (taux de fruit set = 53,9%). Ce régime autogame explique le déficit en hétérozygotes au sein des populations guadeloupéennes. Il est aussi une des principales causes de la différenciation génétique des populations de la Guadeloupe. En incorporant les données géographiques aux analyses, un pattern d'IBD faible mais significatif est révélé. Cependant, la distribution des populations en 2 grands clusters génétiques n'est pas liée à la localisation géographique. Cette structuration pourrait être expliquée par un phénomène d'isolement par l'écologie ou par plusieurs événements de colonisation, ce qui reste à tester. Ainsi, le niveau de diversité des populations de *V. mexicana* en Guadeloupe est évalué plus important au niveau inter populationnel qu'au niveau intra populationnel (Fst=0,15 ; He=0,19). Néanmoins, les analyses effectuées sont limitées par l'effectif des populations et le nombre de marqueurs microsatellites utilisés. Ainsi, il est nécessaire de faire des études complémentaires pour confirmer nos résultats.

Par ailleurs, des mesures de conservation sont discutées d'un point de vue de la conservation ex situ pour représenter la diversité des génotypes en Guadeloupe et in situ pour un renforcement des populations à faibles effectifs.

Mots clés : autogamie, diversité génétique, Guadeloupe, microsatellites, *Vanilla mexicana.*

ABSTRACT

Vanilla mexicana Mill (Orchidaceae) is an ancestral vanilla species distributed in Central America. In the guadeloupean populations of *V. mexicana*, the study aims evaluate the genetic diversity level and the genetic differentiation of the populations thank to microsatellite markers. Another objective is also to study the reproductive strategy consequences on the genetic diversity and structuration. The analyses in Guadeloupe Island were performed by using 6 genetic microsatellite markers. A total of 131 samples were collected from 12 sites in Guadeloupe. Two other samples coming from Martinique and Mexique completed our analyses. Finally, a panel of 51 samples genotyped with 3 polymorphic loci (HU03, HU07, and HU09) were retained for genetic analyses. In Guadeloupe, measures of reproductive biology indicate a high fruit set (53, 9%) and suggest that *V. mexicana* is able to self-pollinate and autogamous. The autogamy explains heterozygote deficit in guadeloupean populations and significant genetic differentiation among populations. Taking into account the geographical distribution of genotypes, a low isolation-by-distance pattern is revealed. However, the 2 genetic clusters at the scale of Guadeloupe are not related to the population distribution. Other factors, like isolation-by-ecology or colonisation events could explain this population structure. In Guadeloupe, genetic diversity of *V. mexicana* were higher among population than within population (Fst=0, 15; He=0, 19). Nonetheless, analyses are limited by low effectives of population and by low number of polymorphic microsatellites available. So complementary analyses are needed to confirm our results. Conservation guidelines are also discussed to protect *V. mexicana* in Guadeloupe with ex situ collections of representative genotypes of Guadeloupe and in situ reinforcement of small populations.

Key words: autogamy, genetic diversity, Guadeloupe, microsatellites, *Vanilla mexicana.*