

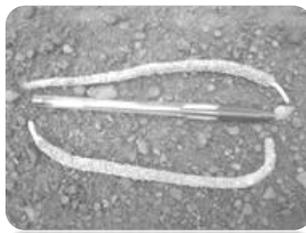
COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
ACADÉMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE - GEMBOUX AGRO-BIO TECH



**STRUCTURATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU GENRE *MILICIA*:
TAXONOMIE, PHYLOGÉOGRAPHIE, DYNAMIQUE DES POPULATIONS**

Kasso S. DAÏNOU

Essai présenté en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie
biologique



Promoteurs: Pr. Jean-Louis DOUCET, Pr. Grégory MAHY

Année 2012

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE
ACADÉMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITÉ DE LIÈGE - GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**STRUCTURATION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU GENRE *MILICIA*:
TAXONOMIE, PHYLOGÉOGRAPHIE, DYNAMIQUE DES POPULATIONS**

Kasso S. DAÏNOU

Essai présenté en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie
biologique

Promoteurs: Pr. Jean-Louis DOUCET, Pr. Grégory MAHY

Année 2012

Résumé

Caractériser l'organisation de la diversité génétique par une approche phylogéographique participe à une meilleure connaissance des processus évolutifs affectant les populations de plantes. La présente thèse s'est attelée à comprendre dans quelle mesure les variations paléoenvironnementales ont pu modeler la structure génétique des populations d'une espèce commerciale africaine, *Milicia excelsa* (Welw) C.C. Berg. La résilience des plantes étant aussi liée à leurs traits d'histoire de vie, l'étude a également eu pour objectif de décrire les caractéristiques reproductives de l'espèce, afin de les mettre en relation avec les patrons de diversité observés. L'analyse phylogéographique a été réalisée quasiment à l'échelle de l'aire de distribution de *M. excelsa*, à l'aide de marqueurs nucléaires et chloroplastiques. La caractérisation autécologique par contre a été limitée à une population située au Sud-Est du Cameroun.

M. excelsa étant généralement confondu avec une espèce morphologiquement très proche, *M. regia* (A. Chev) C.C. Berg, une vérification de la proximité morpho-génétique des deux taxons a d'abord été effectuée. Elle a confirmé une forte ressemblance botanique entre les deux taxons. De plus, une assignation bayésienne et une analyse de l'isolement reproductif ont suggéré l'existence de croisements interspécifiques, mais uniquement dans une direction: les hybrides affichaient le morphotype *M. regia*. Assez étrangement aussi, l'Afrique subsaharienne à l'Est du Ghana ne présente que le morphotype *M. excelsa*, alors que *M. regia*, davantage adapté aux forêts humides, aurait dû être présent aussi dans le bassin du Congo. Les populations occidentales de *M. excelsa* à partir du Nigéria s'avèrent bien différenciées génétiquement de celles d'Afrique Centrale, aussi bien au niveau de l'ADN nucléaire (ADNn) que chloroplastique (ADNcp). Il n'existe pas d'haplotype partagé entre l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Ouest, résultat surprenant dans la mesure où de fortes distances de dispersion génique ont été déterminées, concordant avec le comportement des principaux animaux disperseurs observés: la chauve-souris *Eidolon helvum* et les perroquets *Psittacus erithacus* et *Agapornis swindernianus*. Par ailleurs, l'existence de pools géniques bien différenciés au Gabon et au sud de la R.D. du Congo en particulier, et l'accumulation de mutations au sein des clusters Ouest et Centre-africains tendent à confirmer l'hypothèse de refuges forestiers. A une échelle spatiale bien plus limitée, les patrons de structure génétique semblent aussi faiblement influencés par des temps de reproduction divergents entre individus en sympatrie. On retiendra enfin que les niveaux de diversité génétique estimés au sein des pools géniques ne sont pas moins importants que ceux observés chez d'autres espèces arborées.

Si la phylogéographie permet d'inférer sur l'histoire de la végétation, elle nécessite souvent la disponibilité de données écologiques ou biologiques pour la validation de certaines incertitudes. De telles données font souvent défaut pour les écosystèmes tropicaux et la présente thèse a fait ressortir des questions et perspectives pour les recherches futures, aussi bien en ce qui concerne la morphologie que la phylogéographie de *Milicia*.

Mots clés: *Milicia* spp., diversité génétique, phylogéographie, hybridation, phénologie, dispersion, forêts tropicales humides, refuges forestiers.

Summary

Characterizing population genetic structure using phylogeographic approach contributes to understanding of evolutionary processes that affect plant populations. The present study investigated how past environmental variations can shape the spatial genetic diversity of an African timber tree species, *Milicia excelsa* (Welw) C.C. Berg. Given that plant responses to disturbances are closely linked to life history traits, this research also aimed to describe relationships between the reproductive traits of *M. excelsa* and its population genetic structure. Phylogeographic analyses were performed throughout the range of *M. excelsa* using nuclear and chloroplastic markers. Ecological characterization was conducted for a single population located in south-East Cameroon.

Since *M. excelsa* is similar to the other species of its genus, *M. regia* (A. Chev) C.C. Berg, we first performed a morphogenetic comparison of these two taxa. The results confirmed an important morphological similarity between the two species with very rare discriminating criteria. In fact Bayesian assignment methods and reproductive isolation patterns suggest the occurrence of interspecific hybridization, which appeared to be unidirectional: hybrids displayed the *M. regia* morphotype. Because *M. regia* is known to be more adapted to humid tropical forests, one may expect it to occur in the Congo basin zone. However, its range is restricted to the western part of West Africa while *M. excelsa* occurs from Guinea-Conakry to Zimbabwe. Interestingly, in the case of *M. excelsa*, Central and West African specimens had no shared haplotype. This result was unexpected because long gene dispersal distances were found in Cameroonian populations, as expected from the behaviours of the main dispersal animals we identified, the bat *Eidolon helvum* and the parrots *Psittacus erithacus* and *Agapornis swindermanus*. In general, despite the likelihood for long distance seed dispersal, distinct genetic clusters were identified over West and Central Africa and their location may support the forest refugia hypothesis. In addition a phylogeographical signal was detected in chloroplast DNA indicating a prolonged separation between West and Central Africa populations with an accumulation of new mutations. At a smaller spatial scale, patterns of genetic structure also seemed to be weakly influenced by divergent reproduction times among sympatric individuals. The level of genetic diversity in the study populations falls within the range of values calculated for other tropical tree species.

If phylogeography helps to infer population history, it also requires ecological or biological information to confirm some uncertainties. Such detailed data were often lacking to completely interpret numerous of our results. The present study raised new questions and led to new perspectives for further investigation both in phylogeography and botany.

Keywords: *Milicia* spp., genetic diversity, phylogeography, hybridization, phenology, gene dispersal, seed dispersal, tropical rainforests, forest refuges.

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures.

Remerciements

Il est des dettes qu'on ne finit jamais de payer... Je ne vois pas d'autres mots pour exprimer ma reconnaissance à trois personnes qui ont marqué de leurs empreintes mes travaux de recherche. Le professeur Jean-Louis Doucet d'abord: comment décrire ce que je lui dois? C'est simple: sans son soutien, son acharnement, ses conseils et son amitié, cette thèse n'aurait certainement pas vu le jour, du moins, pas en son état actuel. Et bien au-delà du cadre professionnel, "*akpé na wo*" (merci en Mina) Jean-Louis pour tout ce que tu m'as apporté. Le professeur Grégory Mahy m'a initié à la génétique moléculaire et n'a cessé de suivre avec attention mon évolution: le titre de la présente thèse trahit parfaitement l'importance que j'accorde aujourd'hui à l'écologie génétique et l'étendue de son influence sur ma carrière future. Professeur Brice Sinsin, c'est un peu grâce à vous que je suis tombé amoureux de l'arbre des sorciers, l'iroko. Merci d'avoir eu confiance en un jeune et novice ingénieur, en lui confiant la mise en œuvre d'un projet de restauration de cette essence dans la zone de Toui-Kilibo au Bénin. Et merci simplement d'être toujours à mon écoute et de me considérer comme un ami.

Un travail de thèse ne s'accomplit pas entre quelques scientifiques. En plusieurs occasions, j'ai eu la chance de bénéficier de l'appui de divers autres chercheurs et enseignants, spécialement Jacques Rondeux, Jean-Pierre Baudoin, Olivier Hardy, Myriam Heuertz, Cédric Vermeulen, Yves Brostaux, Jean-Philippe Bizoux et Willy Delvingt. "*kpè nou mi*" (merci en Fon) pour avoir considérablement amélioré ce travail, par votre disponibilité, vos critiques constructives, vos encouragements et vos lectures attentives. Je garde également d'excellents souvenirs de mes discussions avec MM. Philippe Lejeune, Jacques Hébert, Jérôme Duminil et Sylvie Gourlet-Fleury.

Cette recherche a pu aboutir grâce à divers financements, particulièrement ceux de Gembloux Agro-Bio Tech (ULg), de Nature Plus asbl, du Fonds Léopold III, et de la société forestière Pallisco. Cette société, qui ne cesse de démontrer son souci d'une gestion durable des forêts africaines, a été en effet le théâtre de mes recherches écologiques. A travers son staff dirigeant dont MM. Michel Rougeron, Loïc Douaud et Richard Fétéké, Pallisco a mis à ma disposition des moyens humains et matériels importants. Messieurs, "*é ché oun*" (merci en Idatcha).

Difficile d'évoquer Pallisco sans penser aux "gars": Théophile AyoI, Paul Zok, Crépin Ndjopandé, Emerand Gassang, Arnaud Biassui, Séverin Zoa, Merlin Ngroa, Charles Mbida, Luc Manemama, et tous les autres ouvriers temporaires qui ont activement contribué à la collecte des données de terrain. Je vous dois la qualité de ces résultats chers amis.

Le lecteur se rendra vite compte qu'un considérable travail de collecte de matériel végétal et de données a été effectué à travers l'Afrique. L'analyse de la diversité génétique de l'iroko sur une bonne partie du continent est le fruit de l'appui de plus d'une trentaine de personnes, généralement citées en fin de chaque article (chapitres résultats: 4 à 7). Une fois encore, merci à tous. Forcément, je me sens extrêmement redevable envers Michaël Pluijgers qui, dans le cadre de son travail de fin d'études, a participé avec entrain et grande volonté à l'analyse des résultats génétiques. Ce fut un plaisir de travailler avec toi Michaël. Je n'oublie pas non plus Aline Baudoin, dont les travaux sur la banque de graines m'ont davantage éclairé sur la stratégie de régénération de l'iroko et d'autres espèces forestières tropicales. Merci aussi à Eric Laurenty qui a passé des journées entières et des nuits

blanches à mes côtés, en pleine forêt camerounaise, à tenter d'observer et identifier les disperseurs de graines d'iroko.

Jean-Yves Devleeschouwer, Achille Biwolé, François Meurrens, Charles-Albert Petre et Nikki Tag, sans vos relectures attentives et vos divers commentaires, ce document serait encore truffé de fautes ou de phrases incompréhensibles. Et modestes avec ça, aucun de vous ne veut admettre l'ampleur de l'aide qu'il m'a apporté. C'est pour ce genre de choses que je tiens à votre amitié.

Vous, collègues ou amis de l'Unité de Gestion des Ressources forestières et Milieux naturels, vous m'avez aussi aidé d'une manière ou d'une autre, directement ou non. Lambert Kouadio, Jean-François Gillet, Julien Philippart, Christian Moupela, Nils Bourland, Sandrine Louis, Damien Vincke, Michèle Federspiel, Marie Fombona, Cédric Geerts, Alain Monseur, Pascal Thibaut, Lahcen Hadiy et toutes les autres personnes de l'Unité que j'ai pu croiser à un moment ou un autre, merci pour vos sourires et vos soutiens divers et variés.

Hors contexte universitaire, mes tribulations doctorales m'ont permis de renforcer ou tisser de belles relations d'amitié. Chers Judith Rijbroek, Hélianthe Adam, Yolán Adam, Anne-Christine Gouder de Beauregard, Djibril et Zenabou Fétéké, Fabien et Jeanne Hountondji, Didier Hubert, Sylvain et Diane Kpènavoun, Geneviève Martin, Benoît Bedin, Bonaventure Sonké, Prosper et Lucrèce Sagbo, Etotépé Sogbohossou, Arnaud Atindéhou, Emilien Dubiez, Pierre Procès, c'est un réel bonheur de savoir que je compte un peu pour chacun de vous.

S'il est des dettes qu'on ne finit jamais de payer, il y en a d'autres qu'on n'envisage même pas de rembourser, parce que cela n'aurait aucun sens, et parce que toute une vie n'y suffirait pas. Sans vous, Ogoubi, Paula, Maya, Ishéni, Araq, Ayéjo, Choni, Modukpè, tout aurait été... si différent! Puissé-je avoir la chance d'être encore des vôtres pendant très longtemps.

Table des matières

RÉSUMÉ	5
SUMMARY	6
REMERCIEMENTS	8
TABLE DES MATIÈRES	10
AVANT-PROPOS	12
1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
1.1. L'HISTOIRE BIOGÉOGRAPHIQUE DES FORÊTS DENSES HUMIDES TROPICALES.....	14
1.2. LA STRUCTURE GÉNÉTIQUE EN LIEN AVEC LES TRAITS DE VIE ET LA DYNAMIQUE HISTORIQUE FORESTIÈRE.....	18
1.3. ADN ET MARQUEURS MOLÉCULAIRES.....	21
1.4. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES ARBRES TROPICAUX D'AFRIQUE: LE CAS DE <i>MILICIA EXCELSA</i>	23
2. OBJECTIFS ET STRUCTURATION DE LA THÈSE	25
2.1. OBJECTIFS ET QUESTIONS SPÉCIFIQUES.....	25
2.2. STRUCTURATION DE LA THÈSE.....	26
3. IDENTITÉ ET ÉCOLOGIE DES ESPÈCES FORESTIÈRES COMMERCIALES D'AFRIQUE CENTRALE: LE CAS DE <i>MILICIA SPP. (ARTICLE 1)</i>	29
3.1. INTRODUCTION.....	30
3.2. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE ET PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DE L'ARBRE.....	30
3.3. LE DÉBAT PHYLOGÉNÉTIQUE AUTOUR DE L'IROKO: UNE OU DEUX ESPÈCES DE <i>MILICIA</i> ?.....	31
3.4. IMPORTANCE SOCIO-ÉCONOMIQUE DE L'IROKO.....	34
3.5. REPRODUCTION ET RÉGÉNÉRATION DE L'IROKO.....	36
3.6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	41
4. CARACTÉRISATION MORPHOGÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE <i>MILICIA EXCELSA</i> ET <i>M. REGIA</i> EN AFRIQUE: INFÉRENCE DE LA DYNAMIQUE HISTORIQUE DES POPULATIONS ET DES ÉVÈNEMENTS D'HYBRIDATION ENTRE LES DEUX ESPÈCES (<i>ARTICLE 2</i>)	42
4.1. INTRODUCTION.....	43
4.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	45
4.3. RÉSULTATS.....	48
4.4. DISCUSSION.....	60
4.5. CONCLUSION.....	65
5. FOREST REFUGIA REVISITED: NSSRS AND CPDNA SEQUENCES SUPPORT HISTORICAL ISOLATION IN A WIDE- SPREAD AFRICAN TREE WITH HIGH COLONIZATION CAPACITY, <i>MILICIA EXCELSA</i> (MORACEAE) (<i>ARTICLE 3</i>)	66
5.1. INTRODUCTION.....	67
5.2. MATERIALS AND METHODS.....	69
5.3. RESULTS.....	74
5.4. DISCUSSION.....	82
6. SPATIAL GENETIC STRUCTURE IN <i>MILICIA EXCELSA</i> (MORACEAE) INDICATES EXTENSIVE GENE DISPERSAL IN THIS LOW DENSITY AFRICAN TROPICAL TREE (<i>ARTICLE 4</i>)	86
6.1. INTRODUCTION.....	87
6.2. MATERIALS AND METHODS.....	88
6.3. RESULTS.....	92

6.4. DISCUSSION.....	95
6.5. CONCLUSION	97
7. LIFE-HISTORY TRAITS OF A TROPICAL TIMBER TREE SPECIES: EVIDENCE OF REPRODUCTIVE ISOLATION AND INTERACTIONS BETWEEN PHENOLOGICAL AND SEED DISPERSAL COMPONENTS (ARTICLE 5)	99
7.1. INTRODUCTION.....	100
7.2. MATERIALS AND METHODS	102
7.3. RESULTS.....	105
7.4. DISCUSSION.....	111
7.5. CONCLUSION	114
8. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	115
8.1. EN DÉFINITIVE, UNE OU DEUX ESPÈCES DE MILICIA?.....	115
8.2. HISTOIRE PALÉOGÉOGRAPHIQUE DES POPULATIONS DE M. EXCELSA	117
8.3. FLUX DE GÈNES AU SEIN ET ENTRE POPULATIONS DE M. EXCELSA	118
8.4. INTÉRÊT DES RÉSULTATS POUR LA GESTION DURABLE DES POPULATIONS D'IROKO.....	120
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	125
ANNEXE 1. INFORMATIONS COMPLÉMENTAIRES DU CHAPITRE 4 (ARTICLE 2).....	147
ANNEXE 2. SUPPORTING INFORMATION OF CHAPTER 5 (ARTICLE 3)	157
ANNEXE 3. ANALYSE DE LA BANQUE DE GRAINES DU SOL DE LA ZONE D'ÉTUDE.....	171

Avant-propos

La présente thèse se penche sur l'organisation de la diversité génétique au sein du genre *Milicia* (iroko), et concerne de façon plus détaillée l'espèce *Milicia excelsa*. Cette espèce largement distribuée à travers l'Afrique tropicale est un des principaux arbres commerciaux du continent. Il en a résulté une réduction importante de sa densité dans de nombreuses régions, diminution d'autant plus inquiétante que les tentatives de plantation donnent de piètres résultats. Nous avons choisi cette espèce comme modèle d'étude de l'organisation de la diversité génétique d'une plante arborée, en basant l'interprétation des résultats sur les perturbations paléoclimatiques, anthropiques et les facteurs biotiques.

Les résultats du programme de recherche ont été publiés au fur et à mesure qu'ils s'avéraient novateurs ou originaux, et permettaient d'expliquer certains faits, voire soulevaient d'autres questions fondamentales. Dans ce document, ces résultats sont donc présentés sous forme d'articles, en préparation, soumis ou sous presse, et publiés. Cette présentation et les spécificités exigées par chaque revue confèrent au présent document les particularités suivantes qui méritent d'être signalées:

- le français reste la langue dominante de présentation de la thèse (chapitres 1, 2, 3, 4 et 8), mais certains chapitres de résultats ont été rédigés en anglais (chapitres 5, 6 et 7 en l'occurrence);
- afin de ne pas alourdir inutilement la thèse et pour éviter les redondances, la liste bibliographique des différents articles a été intégrée dans une seule liste en fin de document (et avant les annexes);
- chaque chapitre comporte une numérotation spécifique des figures et tableaux.

Une discussion générale clôt le travail (chapitre 8) en rappelant les résultats fondamentaux, les perspectives de recherches futures sur le sujet, et en suggérant des pistes pour leur utilisation dans le cadre d'une gestion durable des populations d'iroko.

1. Introduction générale

1.1. L'histoire biogéographique des forêts denses humides tropicales

La diversité biologique des forêts tropicales fait l'objet de recherches scientifiques croissantes, de par son importance pour chacun des trois niveaux de biodiversité intégrés dans le concept du même nom (McNeely et al. 1990) et de par l'abondance des taxons méconnus qu'on y trouve. Par comparaison à d'autres biomes terrestres, la richesse de la flore tropicale serait avant tout liée aux positions latitudinales de ces écosystèmes (Pianka 1966) et la pluviométrie (Gentry 1988). A l'échelle des régions, la diversité taxonomique serait liée aussi à la combinaison d'une multitude d'autres facteurs abiotiques et biotiques, ainsi qu'à leurs variations dans le temps, dont: l'énergie disponible, estimée par des variables telles que l'évapotranspiration, la température moyenne annuelle et la productivité primaire (Gaston 2000; Bonn et al. 2004); les patrons des relations proies-prédateurs (Janzen 1970; Chesson 2000); et les perturbations de la voûte forestière (Denslow 1987; Philipps et al. 1994).

Le continent africain possède une fraction non négligeable de la diversité floristique des forêts tropicales, bien que cette biodiversité y soit d'une ampleur inférieure à celle observée en Amérique et en Asie tropicales (White 1983; Linder 2001; Parmentier et al. 2007). Ces différences s'expliquent en partie par la variabilité historique et géographique des phénomènes majeurs façonnant la richesse spécifique, dont la dérive des plaques continentales, les changements climatiques, les événements aléatoires de dispersion, les activités géologiques et les reliefs et sols qui en découlent (Vandeweghe 2004; Plana 2004). En Afrique, les forêts denses humides (sempervirentes à semi-décidues) s'observent entre les latitudes 6°N et 6°S, formant le Centre régional d'endémisme Guinéo-Congolais (White 1983) principalement concentré en Afrique Centrale (Mayaux et al. 2004). Sur plus de 8.000 espèces de plantes répertoriées dans le bloc Guinéo-Congolais, 80% au moins y seraient endémiques (White 1983). En dehors du Centre du Kivu, les plus importantes richesses spécifiques sont notées sur les façades Atlantique couvrant l'Ouest du Cameroun et du Gabon d'une part, et le Sud de la Guinée, du Libéria et de la Côte d'Ivoire d'autre part (Linder 2001). Ces régions de grandes richesses floristiques coïncident avec les zones de maximum de pluviométrie et de faible saisonnalité, à températures moyennes faibles, ainsi qu'avec les zones d'importantes variations altitudinales (Plana 2004; Parmentier et al. 2011). Par ailleurs, considérant la richesse faunique en Afrique Centrale, Maley (1996) et Colyn et al. (1991) ont aussi proposé l'existence d'un centre majeur de biodiversité dans une région essentiellement riveraine du Bassin du Congo. L'importance des habitats ripicoles comme abris de grande diversité a été par la suite confirmée pour certaines plantes (Robbrecht 1996; Wieringa & Gervais 2003). Globalement, les centres d'endémisme coïncident bien avec les centres de richesse spécifique (Linder 2001), mais également avec les zones qualifiées de refuges forestiers en Afrique Centrale et Occidentale (Maley 1996) (figure 1b).

i) Glaciation et dynamique forestière. Le concept de refuge forestier est à l'origine d'une des hypothèses majeures de dynamique végétale et de diversification floristique. L'existence des refuges forestiers découlerait des cycles d'oscillation climatique que subit régulièrement la Terre tous les 41.000 à 100.000 ans (Hewitt 2004). Si ces alternances de périodes glaciaires et interglaciaires semblent avoir eu peu de conséquences sur la dynamique des peuplements végétaux amazoniens par exemple (Colinvaux et al. 1996; Kastner & Goñi 2003), elles semblent clairement avoir provoqué une dynamique de végétation marquée en Europe (Bennett et al. 1991)

et en Afrique, notamment tout au long du Quaternaire (de 1,8 Ma à aujourd'hui; Maley 1991). Particulièrement depuis 800.000 ans environ, l'Afrique a connu des périodes arides glaciaires, provoquant des fragmentations et réductions notables du couvert forestier au profit des flores savaniques et montagnardes. Les deux dernières périodes glaciaires africaines sont survenues pendant le Pléistocène, entre 160.000 et 130.000 ans BP d'une part, et entre 24.000 et 11.000 ans BP d'autre part (Maley 1996). Durant ces phases, la forêt dense tropicale n'aurait subsisté que dans des sites offrant toujours des conditions propices à son maintien: présence de nuages stratiformes persistants provoquant une atmosphère humide et ombragée, au niveau des altitudes moyennes des régions montagneuses ou dans des plaines et galeries ripicoles (Maley 1996; Plana 2004). Ces sites correspondent aux refuges forestiers (figure 1b).

Le maximum de la dernière période glaciaire a été atteint vers 15.000 ans BP (Maley 1996). Au-delà de cette date, la forêt tropicale s'est progressivement réinstallée et a occupé l'aire qui lui est décrite aujourd'hui dès 9.000 - 10.000 ans BP (Elenga et al. 2004). Toutefois, une autre régression forestière, quoique de moindre ampleur, a été constatée entre 2.000 et 2.800 ans BP (Maley & Brenac 1998). Celle-ci n'a pas été provoquée par une baisse de température, mais plutôt par un accroissement de la saisonnalité sans une baisse de la pluviométrie annuelle, ce qui a généré d'importants glissements de terrain et érosions. De nombreuses analyses cartographiques ou palynologiques couplées à des datations par radiocarbone continuent d'affiner la dynamique historique récente des forêts d'Afrique Centrale (Vincens et al. 1998; Delègue et al. 2001; Bonnefille 2007; Ngomanda et al. 2007; Giresse et al. 2008). D'une manière générale, ces études tendent à montrer que la recolonisation forestière se poursuit encore, et ce depuis 500 à 2.000 ans selon les localités.

ii) Modèles de spéciation relatifs aux refuges forestiers. Si les maxima glaciaires ont certainement provoqué l'extinction de nombreuses espèces, ils expliqueraient aussi le niveau élevé de diversité et d'endémisme noté au sein de ces refuges, selon une théorie de spéciation allopatrique largement acceptée (Plana 2004). Cela s'expliquerait essentiellement par deux processus (Plana 2004; Born 2007): (a) les zones refuges sont très différentes entre elles, générant des pressions de sélection et adaptations différentes, en plus de l'effet de la dérive génétique; (b) les capacités intrinsèques d'expansion des espèces présentes dans ces refuges étant très variables d'un taxon à l'autre, l'amélioration des conditions climatiques (période interglaciaire) n'a pu réellement favoriser que certains taxons dont les populations issues de divers refuges ont pu recoloniser rapidement les régions plus ou moins éloignées de ceux-ci: une bonne part de la diversité serait donc restée aux abords de ces mêmes refuges. Ces deux mécanismes expliqueraient ainsi la forte diversité des zones refuges par rapport aux régions qui en sont éloignées. L'endémisme selon ce modèle découlerait donc d'une spéciation essentiellement allopatrique.

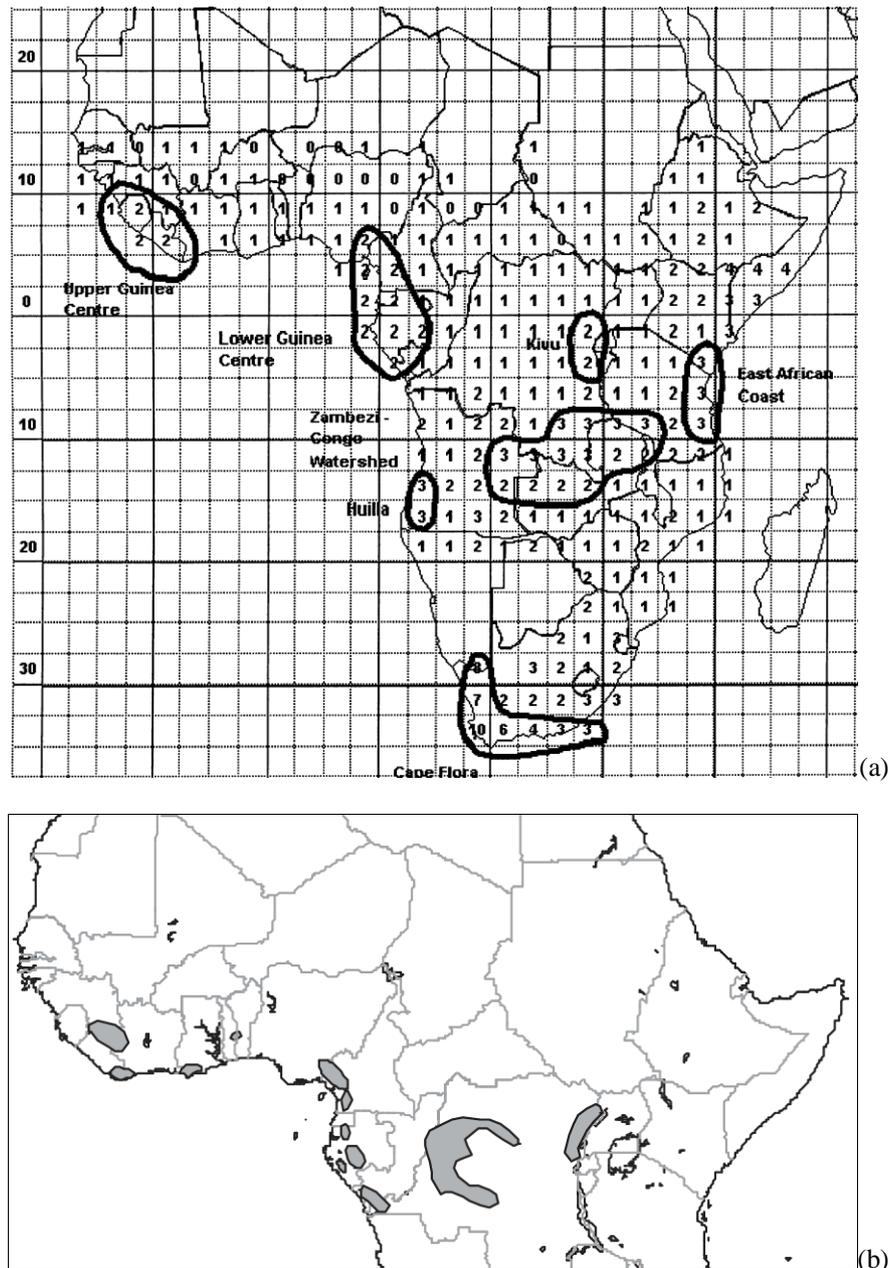


Figure 1. (a) Indices "corrigés" d'endémisme ($I_c = 0, 1, 2, \dots$) et centres majeurs d'endémisme en Afrique Sub-

saharienne selon Linder (2001). $I_c = \frac{\sum_{j=1}^{N_c} i_{j(c)}}{N_c}$ et $i_{j(c)} = \frac{1}{n_j}$, avec: I_c l'indice total du quadrat c , $i_{j(c)}$ l'indice d'occurrence de l'espèce j dans le quadrat c , c est un quadrat où est présente l'espèce j , n_j le nombre de quadrats où est présente l'espèce j , et N_c le nombre total d'espèces dans le quadrat c . Par défaut, $i_{j(c)} = 0$ dans tous les quadrats où est absente l'espèce j . (b) Refuges forestiers du bloc forestier Guinéo-Congolais établis au cours du Pléistocène (Plana 2004 d'après les travaux de Maley 1996).

Ce modèle de spéciation purement liée à l'instabilité des conditions environnementales et à la fragmentation des populations n'est pas totalement satisfaisant selon certains auteurs, dans la mesure où il suppose également une origine récente pour de nombreuses espèces forestières tropicales (Fjeldså & Lovett 1997). Or, en se basant sur les résultats accumulés en Amérique tropicale, ces auteurs notent que pareille hypothèse (origine phylogénétique récente des espèces forestières) a été réfutée dans nombre de cas (Hackett 1993; Haffer 1997). De plus, sur la

base des résultats de Sibley & Ahlquist (1990) traitant de la phylogénie des oiseaux, et en considérant certains genres à faible capacité de dispersion, Fjeldså & Lovett (1997) observent que les taxons d'origine récente sont trouvés principalement non pas dans le bloc de forêts denses humides, mais plutôt en périphérie de ce dernier. Par ailleurs, lorsqu'on considère des régions situées hors des zones de forêts denses humides, il apparaît que l'endémisme serait en réalité moins corrélé à la richesse spécifique qu'à l'altitude: elle serait surtout importante dans des régions d'altitudes contrastées (collines, montagnes) où coexistent des habitats très diversifiés pouvant générer localement différenciation, voire spéciation par sélection et dérive (Fjeldså & Lovett 1997). En somme, Lovett & Friis (1996) et Fjeldså & Lovett (1997) suggèrent que si les refuges ont pu effectivement concourir à la spéciation floristique, une grande partie de l'endémisme notée en Afrique proviendrait plutôt d'une stabilité des conditions climatiques des zones montagnardes (que celles-ci soient humides ou non) combinée à la diversité des micro-habitats qu'offrent ces sites. De plus, les galeries forestières auraient très bien pu maintenir un flux de gènes significatif entre les populations isolées (Fjeldså & Lovett 1997). A noter que le rôle de la stabilité climatique dans la diversité de la flore tropicale n'est pas une idée nouvelle et avait déjà été émise précédemment par des naturalistes tels que Fischer (1960) ou encore Wallace (1878). Sur le plan évolutif, ces réseaux d'habitats stables et connectés constitueraient donc de véritables "musées forestiers" au sein desquels les faibles taux d'extinction (du fait de la stabilité des conditions), comparés aux taux de mutation, expliqueraient l'endémisme observé. Les espèces seraient donc d'origines très anciennes. Linder (2001) optait également pour ce modèle de spéciation après avoir prouvé que la concordance entre diversité et endémisme était loin d'être parfaite à l'échelle de l'Afrique, et si la pluviométrie explique bien la diversité ou la richesse, elle n'est par contre pas corrélée à l'endémisme si l'on considère toute l'Afrique subsaharienne (figure 1a; Linder 2001). Néanmoins, l'argument d'une origine probablement ancienne des espèces typiques des forêts sempervirentes africaines a été récemment réfuté par Plana (2004): sa compilation des analyses phylogénétiques existantes prouve que (a) les groupes taxonomiques supposés forestiers et affichant clairement des origines très anciennes sont surtout l'apanage des forêts décidues et des savanes et n'ont que de rares représentants en forêts sempervirentes; (b) les genres typiques des forêts denses sempervirentes qui ont fait l'objet de rares études phylogénétiques (exemples: *Berlinia*, *Bikinia*, *Tetraberlinia*, *Aphanocalyx*) s'avèrent être "jeunes" et proviendraient du Pliocène Supérieur ou du Pléistocène. L'auteur en conclut que l'historique des contractions et expansions forestières serait la cause majeure de la composition des forêts denses humides, bien que des études phylogénétiques et phylogéographiques complémentaires, surtout d'espèces arborées, soient indispensables pour confirmer définitivement cette hypothèse.

iii) L'influence non négligeable de l'homme sur la composition des forêts denses humides. L'homme contribue largement aujourd'hui à la réduction du couvert forestier (FAO 2011), tout comme son influence passée sur la composition et la distribution de la flore forestière tropicale s'avère bien plus prononcée qu'on ne le soupçonnait. A titre d'exemple, on estime que l'abondante présence de l'espèce héliophile qu'est l'okoumé (*Aucoumea klaineana*) dans toute l'étendue forestière gabonaise serait due aux pratiques ancestrales de l'agriculture itinérante sur brûlis (Biraud 1959; Doucet 2003). White & Oates (1999) estiment également que des actions anthropiques pourraient être à l'origine des massifs étendus d'*Entandrophragma* en R. du Congo, en République Centrafricaine et en R.D. du Congo. Suivant la même logique, Evrard (1968) suggérait que ces formations à *Entandrophragma* évolueraient naturellement vers des forêts sempervirentes à *Caesalpinaceae*. De nombreuses autres recherches actuellement en cours en Afrique Centrale tendent à confirmer une occupation plus importante que prévu de

l'espace forestier par les peuples migrants d'autrefois (Van Gemerden et al. 2003; Brncic et al. 2006). Cette empreinte humaine expliquerait en partie l'abondance et la persistance actuelle de nombreuses espèces ligneuses héliophiles au sein du bloc forestier.

1.2. La structure génétique en lien avec les traits de vie et la dynamique historique forestière

Les *événements paléoécologiques* responsables des processus de fragmentation, colonisation ou recolonisation s'accompagnent de changements démographiques majeurs, de changements dans les pressions adaptatives à travers la dérive génétique et la sélection naturelle, lesquels influencent globalement l'organisation spatiale de la diversité génétique des espèces (Hewitt 2004). Au cours des deux dernières décennies, des avancées notables en génétique moléculaire ont permis de mieux comprendre et appréhender l'évolution des espèces en relation avec les faits historiques biogéographiques. Une approche relative à de telles recherches combine la génétique des populations à la phylogéographie.

La *phylogéographie* vise à comprendre les principes et processus historiques à l'origine de la distribution des lignées généalogiques d'une espèce donnée (Weising et al. 2005). Ainsi, l'objectif final de cette discipline est d'inférer l'histoire démographique ou tout au moins certaines évolutions démographiques (isolement, expansion, événement de fondation ou goulot d'étranglement) pouvant expliquer la structure génétique de populations intraspécifiques (Beheregaray 2008). Contrairement aux investigations palynologiques destinées à retracer l'histoire de la végétation, la phylogéographie présente l'avantage de pouvoir sonder l'histoire de populations végétales établies à de grandes distances de lacs anciens. Pour ce faire, elle utilise préférentiellement des marqueurs moléculaires non recombinants à hérédité uniparentale, issus notamment des mitochondries et des chloroplastes, dans la mesure où ces organites retiennent mieux que l'acide nucléique nucléaire l'information des migrations passées. Toutefois, un problème récurrent chez les espèces végétales étant la faible variation du génome chloroplastique, des études phylogéographiques ont opté avec divers succès pour l'étude du génome nucléaire, grâce aussi à l'amélioration des outils d'analyse statistique dans ce domaine (Heuertz et al. 2004; Weising et al. 2005; Beheregaray 2008). Si l'analyse du génome cytoplasmique offre l'avantage de pouvoir définir les relations entre les différentes lignées ou populations étudiées, elle nécessite néanmoins la disponibilité de données paléoécologiques et de cartes détaillées de la zone d'étude (pour l'identification de barrières physiques) pour pouvoir inférer sur la dynamique passée de recolonisation (Hewitt 2004).

Cette démarche combinant structure génétique spatiale et données paléoécologiques a servi à définir les voies de recolonisation des plaines du Centre et du Nord européen par diverses espèces ligneuses préalablement réfugiées au sud du continent durant le dernier maximum glaciaire (Demesure et al. 1996; Dumolin-Lapègue et al. 1997; Palmé & Vendramin 2002; Grivet & Petit 2003; Heuertz et al. 2004). En milieu tropical, la majorité des études similaires ont été effectuées en Amérique tropicale (Collevatti et al. 2003; Lira et al. 2003), ainsi qu'en Asie du Sud-est (Vogel et al. 2003). Faisant un bilan des études phylogéographiques effectuées jusqu'en 2006, Beheregaray (2008) notait que 88% de ces études relatives aux plantes terrestres s'adressaient aux espèces de l'hémisphère nord. Il ajoutait qu'en dehors de l'Afrique du Sud, l'Afrique subsaharienne était "plutôt" oubliée.

Les processus de recolonisation post-glaciaire ou d'expansion démographique participent parfois d'une accumulation *d'évènements de fondation*: les individus situés à la limite de la zone de colonisation ont peu de chance d'avoir la totalité des allèles présents dans leur population d'origine, ils n'empruntent qu'une partie de la variabilité génétique des populations dont ils sont issus. Les évènements de fondation de population s'accompagnent donc souvent de perte de diversité associée à une différenciation génétique entre populations fondatrices et initiales, si les flux géniques demeurent limités entre elles ou simplement par dérive génétique (Loveless & Hamrick 1984; Pautasso 2009). Néanmoins, une forte diversité génétique peut également être due à de multiples effets fondateurs sur un même site par jonction d'individus issus de diverses populations (Petit et al. 2003). Ce phénomène a été, par exemple, suggéré pour expliquer un niveau de diversité élevé au sein de certaines populations de *Picea abies* des Alpes Maritimes (Meloni et al. 2007).

Effets fondateurs et *goulots d'étranglement* sont des notions très proches et souvent associées car toutes deux provoquent une réduction de la diversité génétique du fait d'un faible effectif de population (cette réduction de la diversité est liée à une réduction rapide de la taille de population, appelée *bottleneck* en anglais). Toutefois, l'historique des évènements écologiques contribuant à la réalisation de ces processus biologiques ne sont pas identiques. Au contraire de l'effet fondateur qui résulte d'une phase d'expansion ou de colonisation démographique, l'expression "goulot d'étranglement" est surtout utilisée en cas de catastrophes naturelles ou d'actions anthropiques générant une réduction assez brutale des tailles de populations (Lippé 2006). Une perte de la diversité génétique se note alors après quelques générations (4 à 12 générations environ, le délai dépendant de nombreux facteurs: taux de réduction de la population, vigueur démographique de l'espèce, etc.; Cornuet & Luikart 1996; Piry et al. 1999) et se traduit par une diminution notable des allèles rares ainsi qu'une baisse plus lente de l'hétérozygotie (Luikart et al. 1998; Piry et al. 1999). Une population en *bottleneck* n'est pas forcément condamnée à disparaître, mais en cas de taille de population très réduite, le phénomène peut accroître les risques de prévalence de maladies délétères, réduire les capacités d'adaptation et de résistance à l'introduction de facteurs létiaux, toutes choses augmentant les risques d'extinction de la population (Frankham 2005).

Un autre processus façonnant la structure génétique d'une espèce est *l'isolement par la distance* (*isolation by distance* en anglais, ou IBD). Contrairement aux cas précédemment décrits, l'IBD dépend en grande partie des traits d'histoire de vie de l'espèce étudiée. Le concept de l'IBD est basé sur le fait que la dispersion des gènes (par pollen ou graine) est généralement limitée dans l'espace et affiche souvent une forme leptokurtique (Loveless & Hamrick 1984; Levin et al. 2003), ce qui permet de deviner intuitivement que deux individus ont davantage de chances de se ressembler génétiquement s'ils sont proches géographiquement. La ressemblance génétique telle que mesurée par le coefficient de parenté, diminuant avec la distance géographique, cela crée une structure génétique spatiale (SGS) localement (Endler 1977; Hardy & Vekemans 1999). L'intensité de la SGS peut être mesurée par la pente de la droite de régression entre les distances génétiques et les distances géographiques (figure 2; Mantel 1967; Vekemans & Hardy 2004). Cette intensité dépend entre autres du système de reproduction de l'espèce considérée: les espèces à fort taux d'autogamie ou à dispersion de pollen et de graine très limitée tendent à présenter des valeurs élevées de SGS, tandis que la différenciation entre populations ou entre individus éloignés est plus faible chez les plantes dioïques et les hétérostyles (Loveless & Hamrick 1984).

L'isolement reproductif n'est pas toujours le seul fait de l'isolement géographique entre individus ou populations. Au sein d'une même population, les caractéristiques biologiques et phénologiques de l'espèce ainsi que les

patrons de dispersion du pollen et des diaspores peuvent également concourir à un isolement reproductif dans le temps, lequel pourrait même ne pas être détectable dans l'espace. Ce phénomène est décrit par le concept de ***l'isolement par le temps*** (*isolation by time* en anglais, ou IBT). Ce concept est basé sur le fait que l'héritabilité de l'initiation florale peut être assez élevée chez certaines plantes (Geber & Griffen 2003), figeant donc en quelque sorte les dates d'initiation florale individuelles. Cela provoque un flux génique limité entre les individus fleurissant précocement et ceux à floraison tardive (figure 3; Hendry & Dray 2005). A long terme, la reproduction privilégiée entre individus d'un même groupe peut provoquer l'apparition d'une différenciation génétique au sein de la population, voire d'une spéciation sympatrique.

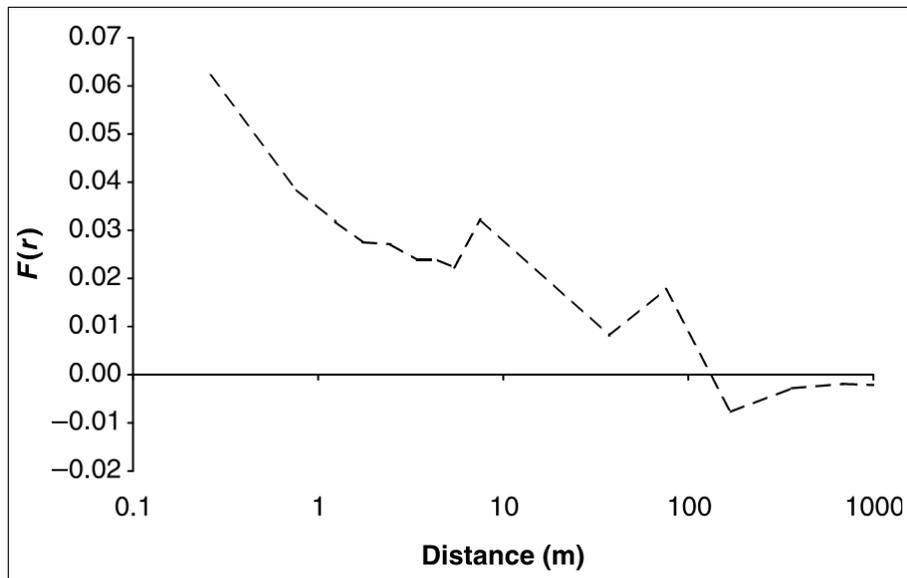


Figure 2. Illustration de l'IBD dans une population de *Chamaecrista fasciculata*: diminution du coefficient de parenté mesuré ici par le paramètre $F(r)$ en fonction de la distance entre paires d'individus (adapté de Vekemans & Hardy 2004).

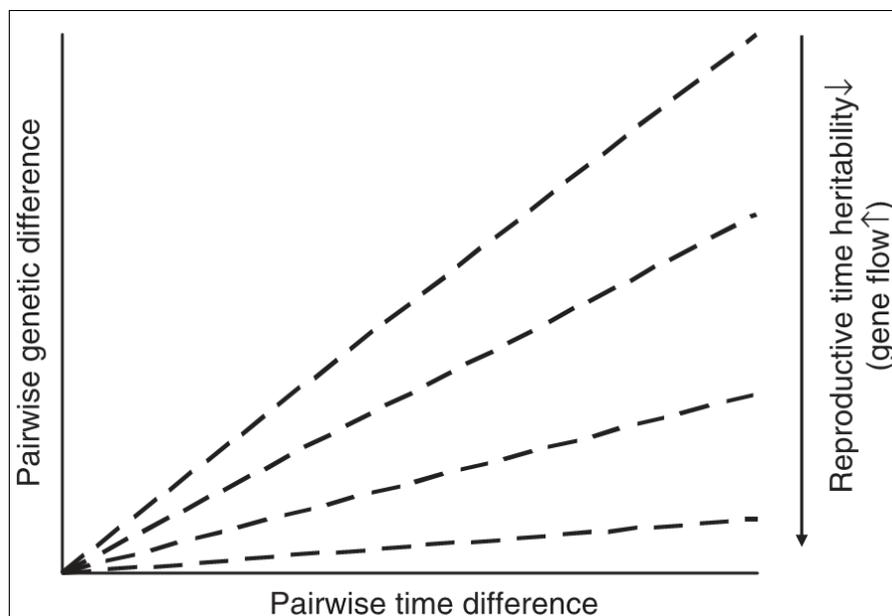


Figure 3. Schématisation de l'influence de l'héritabilité sur l'intensité de l'IBT (accroissement de l'écart génétique en fonction des écarts entre temps de reproduction) (Hendry & Day 2005).

L'interprétation des patrons de structure génétique ou d'isolement reproductif nécessite donc **une bonne connaissance de la biologie et de l'écologie de reproduction et de régénération** du taxon étudié. Or, il ne fait aucun doute qu'il s'agit là de thématiques très peu abordées chez les arbres des forêts denses africaines, particulièrement en ce qui concerne les patrons de phénologie, de pollinisation, de germination et de dispersion des diaspores (White 1994; Sheil & Van Heist 2000; Doucet 2003; de Freitas & Pinard 2008). Ce défaut de connaissances constitue indubitablement un biais probable dans l'explication des résultats des analyses génétiques, lorsque celles-ci émettent des hypothèses sur l'évolution démographique des arbres tropicaux. De nombreux chercheurs continuent de clamer la nécessité d'approfondir les recherches sur les traits écologiques des espèces ligneuses tropicales, mais la tâche n'est pas aisée, pour une multitude de raisons: investissement limité des pays pauvres dans la recherche fondamentale (y compris la formation de scientifiques aptes à s'atteler à la tâche; Beheregaray 2008), contraintes d'observation des arbres à forte longévité et de grandes dimensions (hauteur, distribution spatiale, caractère supra-annuel de la reproduction dans certains cas; White et al. 2007), etc.

1.3. ADN et marqueurs moléculaires

En dehors de quelques virus à ARN (acide ribonucléique), **l'ADN** ou acide désoxyribonucléique est la molécule renfermant l'ensemble de l'information permettant le fonctionnement, le développement et la reproduction des êtres vivants. L'ADN constitue ainsi le génome des vivants, et se présente sous trois variantes possibles: l'ADN nucléaire (ADNn) contenu dans le noyau des eucaryotes, l'ADN mitochondrial (ADNmt) présent dans les mitochondries, et l'ADN chloroplastique (ADNcp) présent uniquement chez les plantes chlorophylliennes. La grande majorité de l'ADN est toutefois contenue dans le génome nucléaire, qui possède ainsi la majorité des gènes. Les rares gènes de l'ADNmt et de l'ADNcp interviennent essentiellement sur les fonctions respectives de ces organites: respiration et photosynthèse. Nous n'aborderons que très peu la description de l'ADNmt qui n'a pas été utilisé dans le cadre du présent travail.

Chez la majorité des organismes, les individus sont diploïdes et l'ADNn comprend alors deux jeux chromosomiques provenant équitablement des deux parents. Le fait que le génome nucléaire offre des chromosomes indépendants procure des locus indépendants (potentiels marqueurs moléculaires), et donc, autant de traces indépendantes des événements affectant la diversité des populations. De plus, l'ADNn est recombinant: un jeu allélique multilocus précis n'est pas stable dans le temps. Tout comme l'ADNmt, l'ADNcp possède un certain nombre de caractéristiques qui le distingue de l'ADNn: (a) il est constitué d'une seule molécule circulaire présente en plusieurs copies (il existe plusieurs chloroplastes et mitochondries dans chaque cellule), (b) il est haploïde et transmis par un seul des deux parents à la descendance, ce qui le rend plus sensible à la dérive génétique et explique la structuration plus rapide entre populations isolées, (c) il n'est généralement pas recombinant (mais voir Marshall et al. 2001 par exemple). Dans la mesure où les locus de l'ADNcp sont génétiquement liés et sont transmis ensemble à la descendance, sans recombinaison possible, une combinaison particulière d'allèles multilocus est relativement stable en l'absence de mutations et constitue un haplotype. Chez environ 80% des Angiospermes, l'ADNcp est transmis par la mère et est donc dispersé par la graine (Matsushima et al. 2008).

Les **marqueurs moléculaires** nucléaires les plus utilisés en génétique des populations et en phylogéographie sont actuellement les marqueurs microsatellites (*Simple Sequence Repeat* en anglais, ou SSR) et ceux de type AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Beheregaray 2008). Les marqueurs SSR sont très polymorphes et permettent d'estimer aussi bien les flux de gènes entre populations intraspécifiques qu'entre espèces voisines (possibilité de détection des formes et zones hybrides entre espèces proches; Duminil & Di Michele 2009). Le polymorphisme des SSR provient de la variation des tailles des allèles d'un même locus: différents allèles présenteront des nombres variables de répétitions du motif. L'une des difficultés dans l'interprétation des données fournies par les SSR est la fréquence relativement élevée de l'homoplasie de taille: des allèles de taille identique n'ont pas forcément des séquences identiques et même si tel est le cas, il n'est pas certain qu'ils soient identiques par descendance (Weising et al. 2005). Mais la principale contrainte quant à l'utilisation des SSR réside surtout dans la nécessité de disposer de marqueurs spécifiques: diverses mutations (insertion, délétion, etc.) affectent fréquemment les régions bordantes (amorces), créant le phénomène d'allèles nuls dans certaines populations, et limitant la transposition de ces amorces vers d'autres espèces congénériques (Weising et al. 2005). Or, le développement de tels marqueurs est souvent fastidieux et coûteux (White et al. 2007; Weising et al. 2005). Au niveau des arbres tempérés, des marqueurs nucléaires SSR (nSSR) ont été développés entre autres pour les taxons *Pinus*, *Picea* et *Populus* (White et al. 2007), *Fagus* (Tanaka et al. 1999), *Quercus* (Dow 1995; Steinkellner et al. 1997), *Pseudotsuga* (Amarasinghe & Carlson 2002). Chez les arbres tropicaux d'Afrique, des nSSR existent notamment pour *Symphonia globulifera* (Aldrich et al. 1998; Degen et al. 2004), *Ceiba pentandra* (Brondani et al. 2003), *Entandrophragma cylindricum* (Garcia et al. 2004), *Vitellaria paradoxa* (Cardi et al. 2005), *Aucoumea klaineana* (Born et al. 2006), *Milicia* spp. (Ouinsavi et al. 2006).

En ce qui concerne l'ADNcp, l'analyse du polymorphisme intraspécifique se fait couramment par l'une des trois approches suivantes: (a) l'analyse de la variabilité des sites de restriction ou cpDNA-CAPS (CAPS = *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), (b) le polymorphisme de marqueurs microsatellites, ou cpSSR, et (c) l'analyse de la variabilité de séquences de fragments de l'ADNcp (White et al. 2007). Contrairement à l'ADNn qui est soumis à de nombreuses forces évolutives, l'ADNcp évolue beaucoup plus lentement. En particulier, les taux de mutation dans l'ADNcp sont beaucoup plus faibles que dans l'ADNn, ce qui facilite grandement le développement de marqueurs utilisables sur des taxons très différents (Weising et al. 2005; Haider 2011). L'utilisation des marqueurs cpDNA-CAPS est toutefois souvent limitée par la très faible variabilité des sites de restriction au sein de l'ADNcp (Weising & Gardner 1999), ce qui les rend quasiment inutilisables en taxonomie des plantes par exemple (Kress et al. 2005). En 1999, Weising et Gardner ont développé 10 paires d'amorces cpSSR qui se sont vite avérées transposables et relativement polymorphes sur de nombreuses angiospermes. Par la suite et de façon similaire, des amorces cpSSR développées initialement pour des taxons bien précis ont pu être utilisées sur d'autres taxons, offrant un large panel d'amorces microsatellites universelles pour l'étude du polymorphisme de l'ADNcp (Cato & Richardson 1996; Chung & Staub 2003; Provan et al. 2004; Cheng et al. 2006). Durant la même période, on s'est aperçu que le caractère stable des gènes de l'ADNcp (séquencés via les ARN de transfert, ou *tms*) combiné à leur similitude entre taxons très différents pouvait servir à cibler et révéler le polymorphisme des régions intergéniques (non codantes) (Haider 2011). C'est ainsi que furent développés différentes amorces plus ou moins universelles offrant la possibilité de sonder la variabilité des introns et autres régions non codantes, au sein ou entre espèces (Taberlet et al. 1991; Tsumura et al. 1996). Le même

raisonnement a pu être appliqué à l'ADN ribosomal afin de produire des amorces universelles de régions intergéniques nucléaires (Sun et al. 1994; Baldwin & Markos 1998; Kress et al. 2005).

1.4. Diversité génétique des arbres tropicaux d'Afrique: le cas de *Milicia excelsa*

Ainsi qu'expliqué dans les paragraphes précédents, les plantes tropicales d'Afrique ont fait l'objet de peu d'analyses de la structuration spatiale de la diversité génétique intraspécifique, et le nombre d'études diminue dramatiquement à l'échelle des forêts denses humides d'Afrique Centrale (Pennington et al. 2004). En dehors des travaux menés au début des années 2000 par Lowe et al. (2000) et Muloko-ntoutoume et al. (2000), les seuls autres travaux relatifs à la phylogéographie des arbres de forêts denses humides n'ont été réalisés qu'au cours des dernières années (e.g., Lowe et al. 2010; Debout et al. 2010; Koffi et al. 2010; Dauby et al. 2010; Duminil et al. 2010). Malgré cette récente éclosion d'études phylogéographiques, il est évident que quelques espèces ne peuvent suffire pour généraliser les patrons de fragmentation-expansion de la végétation forestière africaine. Cette insuffisance de données fait que toute espèce végétale tropicale constitue *ipso facto* un bon modèle d'étude (ou presque) à cette fin.

Milicia excelsa (Welw.) C.C. Berg, ou iroko, est une espèce arborée africaine fréquemment rencontrée dans les forêts semi-sempervirentes et, dans une moindre mesure, les forêts sempervirentes. Cet arbre, très prisé des populations locales (Ofori 2007a) et faisant l'objet d'un commerce international important pour la qualité de son bois (il fait partie des cinq espèces les plus exploitées pour leur bois d'œuvre dans la majorité des pays d'Afrique Centrale; OIBT 2010), peut être considéré comme une espèce privilégiée puisqu'ayant fait l'objet de nombreuses études scientifiques en Afrique de l'Ouest. Pourtant, la documentation disponible ne donne qu'un aperçu insuffisant de l'écologie de reproduction et de la dynamique historique des populations de cette espèce.

Présent également en lisière forêt-savane, voire dans certains habitats localisés en zones de savanes (Aubréville 1959; Berg 1977; Nichols et al. 1998), l'iroko est largement distribué sur une bonne partie de l'Afrique subsaharienne et colonise donc une grande variété d'habitats (figure 4a). Il est également considéré comme une espèce pionnière, s'installant préférentiellement dans les milieux forestiers dégradés (Tondeur 1939). L'aire de distribution de *M. excelsa* chevauche partiellement celle de la seule autre espèce congénère: *M. regia* (A. Chev.) C.C. Berg, théoriquement présente seulement entre le Sénégal et le Ghana (Ofori et al. 2007b) (figure 4b). Très semblables sur le plan morphologique, *M. excelsa* et *M. regia* s'hybrideraient, mais cela n'a pu être confirmé ni morphologiquement, ni génétiquement. Une quantification des flux de gènes au sein et entre populations des deux espèces pourrait être un indicateur des relations génétiques entre ces deux taxons.

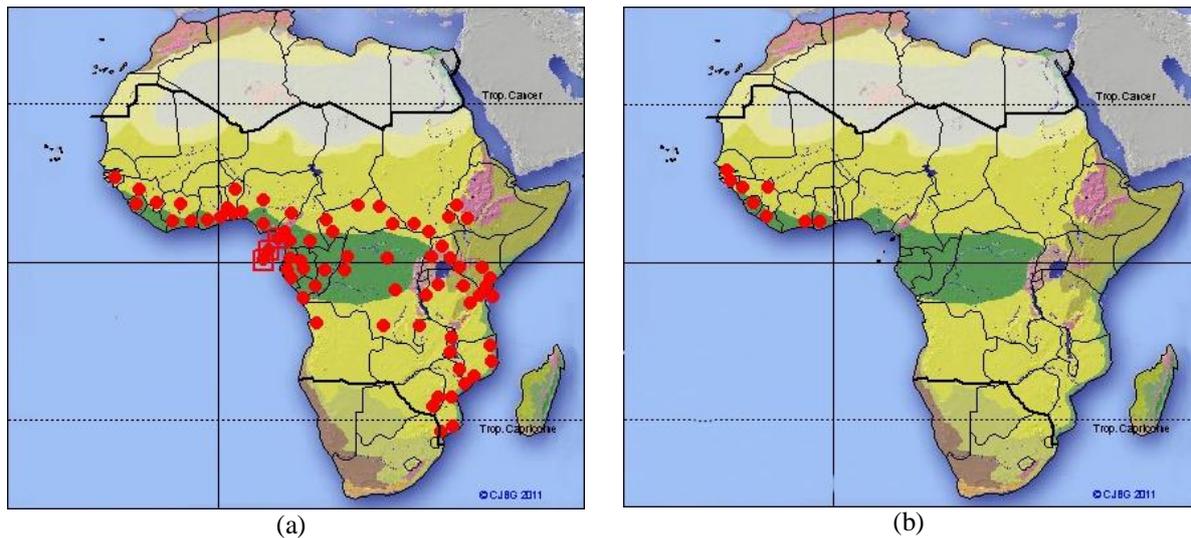


Figure 4. Aires de distribution de *Milicia excelsa* (a) et de *Milicia regia* (b), les deux seules espèces du genre *Milicia*. Cartographie basée sur la localisation des spécimens d'herbier de différents jardins botaniques (Source: www.ville-ge.ch/cjb).

Bien que des informations existent sur l'écologie de reproduction de *M. excelsa*, celles-ci décrivent surtout certaines caractéristiques des populations actuelles et de plus, proviennent majoritairement d'un seul pays: le Ghana (e.g. Nyong'o et al. 1994; Taylor et al. 1999), où d'importantes recherches sont en cours afin d'assurer une gestion durable de cette ressource localement menacée par une exploitation incontrôlée (Nichols et al. 1998). Or, les processus évolutifs pouvant varier d'un habitat à un autre et en fonction des conditions environnementales, la transposition des caractéristiques d'histoire de vie de l'espèce d'un biotope à un autre serait probablement biaisée. Par ailleurs, au-delà de l'aspect descriptif fréquemment adopté par les études autécologiques, une caractérisation de l'écologie de reproduction d'une espèce doit tenter d'identifier les éléments abiotiques et biotiques intervenant dans le déterminisme des phases de reproduction, pour autant que les données existantes le permettent.

Enfin, si certaines populations d'iroko d'Afrique de l'Ouest ont bien fait l'objet d'analyses de leur diversité génétique (Ofori et al. 2001; Ofori et al. 2003; Ouinsavi et al. 2009), l'échelle spatiale d'analyse ne permettait pas d'appréhender ni la variabilité génétique entre régions présentant des histoires d'exploitation forestière très contrastées, ni l'influence des traits biologiques et événements paléocologiques (climatiques, humains) sur la structure génétique spatiale observée. Certes, pour une espèce relativement décimée en certaines localités telle que l'iroko, la simple description de la diversité génétique des populations est pertinente car constituant un outil fondamental d'aide aux stratégies de conservation (Ofori & Cobbinah 2007). Mais les techniques actuelles d'analyse de la diversité génétique ont bien évolué et permettent de mieux appréhender les causes de la structuration génétique (isolement par la distance, isolement reproductif lié au temps, dérive génétique, accumulation de mutations) ainsi que les mécanismes démographiques (expansion vs. régression), et il serait dommage de ne pas les exploiter comme il se doit.

2. Objectifs et structuration de la thèse

2.1. Objectifs et questions spécifiques

L'extraordinaire richesse floristique des forêts denses humides tropicales fut largement documentée à partir du 19^e siècle par de nombreux botanistes. Très vite, divers auteurs suggérèrent que cette diversité résultait des longues périodes de stabilité climatique provoquant de faibles taux d'extinction et une accumulation graduelle de spéciation (Wallace 1878; Dobzhansky 1950; Fischer 1960). La même idée fut reprise par Fjeldså & Lovett (1997) et Colinvaux et al. (1996, 2001) pour expliquer la richesse des forêts tropicales d'Afrique et d'Amérique. Ce modèle de spéciation supposerait donc que la grande majorité des espèces typiques des forêts denses humides d'Afrique daterait de 40 à 50 millions d'années (Pennington et al. 2004), période correspondant à la plus importante diversification de la flore tropicale (Plana 2004).

A contrario, les données récentes en paléocécologie tendent à indiquer que les importantes instabilités climatiques notées en Afrique à partir du Miocène (depuis 23 millions d'années) constituent l'un des principaux moteurs de diversification taxonomique (Maley 1996; Linder & Hardy 2004; Plana et al. 2004). Malgré la notoriété largement acquise par cette dernière hypothèse, elle reste sujette à diverses objections et polémiques dans la mesure où rares sont les données phylogénétiques ou phylogéographiques la confirmant (Plana 2004). Le long temps de génération et la maturité reproductive tardive des arbres en font des modèles idéaux pour de telles études: la lente dynamique spatiale qui en résulte permet de retracer génétiquement l'historique des événements affectant leur distribution, à condition de mettre en relation l'information génétique avec les données paléocécologiques et paléo-anthropiques existantes, ainsi que les capacités d'expansion spatiale de ces espèces. Bien que n'étant pas une espèce typique des forêts denses humides, *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg constitue un bon modèle d'étude de la question, à plusieurs titres: (a) bien que pionnière, l'espèce est longévive avec un diamètre adulte atteignant aisément 1,50 m et un accroissement diamétrique de l'ordre de 0,6 cm/an (Durrieu de Madron 2003); (b) l'iroko présente une large aire de distribution, englobant des zones d'histoires humaines et climatiques différentes, dont les influences peuvent avoir affecté différemment l'organisation de sa diversité génétique; (c) bien que de nombreux points manquent de précision, la littérature fournit déjà un aperçu des traits de vie de l'espèce, rendant davantage fiable l'interprétation des structures génétiques; (d) enfin, des marqueurs spécifiques nSSR ont été développés pour le genre *Milicia* (Ouinavi et al. 2006).

L'utilisation de *M. excelsa* comme modèle d'analyse phylogéographique nécessite toutefois une étude préalable des problèmes taxonomiques au sein du genre *Milicia*. En effet, la présente thèse s'intéresse particulièrement à l'écologie des populations d'iroko de l'Afrique Centrale. Or, si les récents inventaires floristiques signalent uniquement l'espèce *M. excelsa* dans cette région, d'autres études avaient par le passé estimé que *M. regia* s'y trouverait également (Chevalier 1917). La Liste Rouge de l'IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) mentionne d'ailleurs le Cameroun (Afrique Centrale) comme un des pays de distribution naturelle de *M. regia* (IUCN 2010). Il est vrai que les deux espèces ne présentent que de très faibles différences morphologiques, et que *M. regia* est décrite comme mieux adaptée aux forêts denses humides que *M. excelsa* (Aubréville 1959; White 1966; Hawthorne & Jongkind 2006). La question relative à la délimitation des espèces est fondamentale si l'on veut pouvoir définir convenablement les stratégies de conservation ou répondre à des

questions d'ordre écologique (e.g., description de la niche écologique d'une espèce) ou biogéographique (Dayrat 2005). A ce sujet, Padial et al. (2010) ont redéveloppé le concept de taxonomie intégrée (*integrative taxonomy* en anglais; terme initialement proposé par Dayrat 2005) pour démontrer la complémentarité des outils et approches utilisés en génétique des populations, phylogéographie et phylogénie, avec ceux essentiellement morphologiques employés en taxonomie classique.

En résumé, les questions spécifiques abordées par la présente étude sont:

1. Etant donné le rôle crucial des modes de reproduction et de dispersion sur la diversité génétique des populations d'arbres, est-ce que la compilation des données autécologiques existantes permet de dresser un schéma satisfaisant des traits d'histoire de vie de *Milicia excelsa*, spécialement pour le contexte des forêts denses humides?
2. A quels niveaux concordent les divergences morphologiques et les différenciations génétiques entre individus de *Milicia excelsa* et *M. regia*?
3. Existe-t-il des signaux génétiques d'hybridation entre les deux espèces de *Milicia* qui soient détectables par des marqueurs nSSR, et quels mécanismes biologiques ou événements écologiques expliqueraient le degré d'isolement reproductif entre ces espèces?
4. A large échelle spatiale et en combinant l'information génétique fournie aussi bien par des marqueurs nucléaires que chloroplastiques, dans quelle mesure l'organisation spatiale de la diversité génétique des populations de *M. excelsa* peut-elle être expliquée par la théorie des refuges forestiers?
5. A une échelle spatiale plus fine, dans quelle mesure les traits d'histoire de vie de l'espèce et certaines caractéristiques physiques des peuplements colonisés par l'iroko s'imbriquent-ils et affectent-ils les flux de gènes et les capacités d'expansion des populations d'iroko?
6. Toujours à une échelle spatiale fine, quels sont les facteurs abiotiques et biotiques qui interagissent au cours de la reproduction de l'espèce et de la dispersion des diaspores, et qui structurent, ce faisant, le niveau de diversité génétique au sein des populations?

2.2. Structuration de la thèse

La structuration de la présente thèse a consisté à réduire progressivement l'échelle spatiale d'analyse, les questions soulevées par les recherches en amont nourrissant celles devant être effectuées à fine échelle en aval. La thèse compile un ensemble d'articles en préparation, acceptés ou déjà publiés, qui tentent de répondre aux questions précédemment évoquées. L'ordre de ces articles est le suivant:

- **Article 1.** Identité et écologie des espèces forestières commerciales d'Afrique Centrale: le cas de *Milicia* spp. (accepté dans la revue *BASE*).

L'article 1 répond à la question 1. Cette synthèse bibliographique décrit l'état de l'art relatif à l'écologie et à la diversité génétique des populations des deux espèces d'iroko, *Milicia excelsa* et *M. regia*, avec en ligne de mire l'analyse critique des données disponibles et susceptibles de contribuer à une gestion durable des populations d'iroko. Le concept de gestion durable inclut en effet l'aménagement et l'exploitation durable des populations naturelles, mais aussi la nécessité de mettre en œuvre *in situ* ou *ex*

situ des mesures conservatoires pour les populations jugées vulnérables. L'analyse de la documentation disponible s'attarde aussi sur l'histoire d'assignation taxonomique de ces deux espèces, ainsi que sur les critères de différenciation botanique. Enfin, cette synthèse met en lumière l'absence de connaissances sur les populations d'iroko d'Afrique Centrale, qu'elle suggère d'approfondir.

- **Article 2.** Caractérisation morphogénétique des populations de *Milicia excelsa* et *M. regia* en Afrique: inférence de la dynamique historique des populations et des évènements d'hybridation entre les deux espèces (article en préparation).

Cet article aborde les questions 2 et 3, ainsi que la question 4 partiellement. A l'échelle de l'Afrique (ou presque), une approche Bayésienne de regroupement a été utilisée afin de différencier les groupes en équilibre d'Hardy-Weinberg, lesquels ont été ensuite étudiés en détail quant à leur niveau de diversité et aux processus pouvant expliquer la structure génétique. Le positionnement des pools génétiques est ensuite comparé à celui des principaux refuges forestiers, et l'interprétation des niveaux de diversité prend en compte l'historique d'exploitation de l'iroko, spécialement en Afrique de l'Ouest. Enfin, l'étude s'est penchée sur la question de l'hybridation entre les deux espèces, considérant les caractéristiques morphologiques supposées discriminantes entre elles et les assignations individuelles issues des analyses génétiques. Cette étude relève la nécessité de compléter les résultats obtenus par d'autres analyses basées sur d'autres types de marqueurs.

- **Article 3.** Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae) (paru dans la revue *Molecular Ecology*).

Cet article approfondit la question 4 à l'échelle de l'Afrique Centrale où existent plusieurs publications sur les hypothétiques refuges forestiers. Il revient particulièrement sur l'hypothèse de ces refuges comme sources de rayonnement des populations d'espèces forestières de basse altitude, en analysant la diversité génétique des populations de *M. excelsa* à l'aide de marqueurs nucléaires et chloroplastiques, ainsi que l'organisation de cette diversité dans l'espace. Au vu des résultats obtenus, la persistance de la structure génétique spatiale chez cette espèce pionnière et pouvant être dispersée sur de longues distances, a soulevé nombre d'interrogations relatives aux processus spécifiques de reproduction et de dispersion génique.

- **Article 4.** Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree (paru dans la revue *Molecular Ecology*).

L'article 4 aborde la question 5. A une échelle spatiale relativement restreinte, il est admis que les populations d'espèces végétales sont généralement caractérisées par des modèles d'isolement par la distance. L'étude teste cette hypothèse au sein de populations d'iroko du Cameroun. Elle montre également le lien entre les densités de population et le type de végétation d'une part, et les distances de dispersion d'autre part, en relation avec les observations partielles sur les traits d'histoire de vie de l'espèce (observations réalisées dans une concession forestière au Cameroun).

- **Article 5.** Life-history traits of a tropical timber tree species, *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg: evidence of reproductive isolation and interactions between phenological and seed dispersal components (article en préparation pour la revue *American Journal of Botany*).

L'article 5 est une réponse à la question 6. A l'échelle de la population et après six années d'observation, cet article synthétise l'information accumulée sur certains traits d'histoire de vie de l'iroko (phénologie reproductive et dispersion des graines), information souvent partiellement évoquée dans les précédents articles. Plus particulièrement, l'article analyse les déterminants climatiques de la floraison et met en exergue l'existence d'un déterminisme génétique sur cette phénophase. Celle-ci induit une "précocité vs. tardiveté" de floraison ainsi qu'un isolement reproductif dans le temps (IBT) entre individus. Si cette structure génétique temporelle induit une pression de sélection sur la population, il est suggéré que celle-ci pourrait être partiellement atténuée par le comportement du principal disperseur des diaspores d'iroko, la chauve-souris *Eidolon helvum*.

L'ordre chronologique des articles parus n'est pas similaire à leur ordre d'apparition dans la thèse. Exemple: le chapitre 6 reprend l'article 4 qui est paru en 2009 tandis que le chapitre 5 (article 3) a été publié en 2010. Il arrive donc que certains chapitres se réfèrent parfois - pour certains aspects abordés en méthodologie et en discussion - à des articles qui n'apparaissent que dans des chapitres ultérieurs.

Une discussion générale clôt la thèse et synthétise les informations majeures tirées des différents articles, afin d'établir un schéma global de l'histoire des populations d'iroko en Afrique Centrale, prenant en compte les caractères d'histoire de vie de l'espèce et la réponse des populations aux pressions écologiques et anthropiques. Des propositions sont finalement formulées en termes de gestion des populations exploitées, de conservation des populations potentiellement vulnérables et de futurs axes de recherches sur le sujet.

3. Identité et écologie des espèces forestières commerciales d'Afrique Centrale: le cas de *Milicia* spp. (Article 1)

Kasso Dainou, Jean-Louis Doucet, Brice Sinsin, Grégory Mahy

BASE, accepté.

Résumé. Le terme iroko regroupe les deux espèces du genre africain *Milicia* et désigne le bois qui en est dérivé. Malgré une importance économique reconnue depuis plus de deux siècles et une diminution sensible des densités de population du fait de l'exploitation, les connaissances scientifiques utiles à la gestion durable de l'iroko font défaut, particulièrement en Afrique Centrale. L'existence même d'une spéciation au sein du genre *Milicia* mérite d'être revérifiée: les caractères utilisés pour séparer les deux taxons *M. excelsa* (Welw.) C.C. Berg et *M. regia* (A. Chev.) C.C. Berg sont peu consistants et une révision de ces traits distinctifs permettrait de réétudier le niveau de vulnérabilité des populations de *Milicia* spp., et donc de revoir les stratégies de gestion de ce groupe taxonomique. *M. regia* n'a fait l'objet que de rares études écologiques tandis que *M. excelsa*, plus largement distribuée, a retenu l'attention scientifique en Afrique de l'Ouest, dans une certaine mesure. Dans tous les cas, les traits d'histoire de vie conditionnant la diversité génétique et le taux de régénération naturelle méritent d'être identifiés ou mieux décrits. En particulier, les connaissances existantes sur les populations reproductrices, les facteurs régulant la floraison, les patrons de fructification et de dispersion des diaspores, ainsi que d'autres caractères qui amènent à décrire l'iroko comme un arbre pionnier (besoins en lumière, dormance des graines) devraient être mieux documentés. Enfin, la dynamique même des populations naturelles de juvéniles devra également être mieux caractérisée. En l'absence de données fines en écologie, la durabilité de nombreuses ressources ligneuses commerciales est tributaire d'actions sylvicoles, lesquelles peuvent être coûteuses et ne pas être garanties sur le long terme.

Mots-clés: *Milicia*, taxonomie, autoécologie, sylviculture, diversité génétique intraspécifique

Abstract. Iroko designates the two African tree species *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg and *M. regia* (A. Chev.) C.C. Berg known as highly valuable in the timber trade. Despite its economical importance and a decrease in population densities due to exploitation, there is a significant lack of ecological and silvicultural knowledge required for a sustainable management of iroko. In West Africa, *M. excelsa* has received more attention from scientists than *M. regia*, but several topics clearly need further investigations or outcomes cannot be transferred in the context of Central African rainforests. A first thing to verify is whether speciation really occurred in the genus *Milicia*: morphological differences between the two species are very low, and a revision in this genus may lead to some rearrangements of conservatory and management policies related to this taxonomic group. Furthermore, (i) patterns related to the reproductive phenology and its controlling factors, (ii) gene flow among and between populations and individuals regarding life history traits, influence of human activities and paleoecological perturbations, and (iii) dynamics of seedling populations are among aspects that require emphasis in order to propose efficient tools for forest managers. Unless scientists provide these crucial data, the abundance of iroko in tropical rainforests will only depend on expensive plantations activities.

Keywords: *Milicia*, taxonomy, regeneration, ecology, silviculture, genetic diversity.

3.1. Introduction

L'Afrique Centrale possède le second plus grand massif continu de forêts denses tropicales (Mayaux et al. 2006). Bien que régressant à raison de 0,16% par an (Duveiller et al. 2008), ces forêts font partie des écosystèmes tropicaux les mieux préservés (FAO 2011), mais aussi les plus méconnus en termes de caractérisation de leur biodiversité (Doucet 2003). Si l'agriculture itinérante sur brûlis et les besoins en énergie domestique constituent aujourd'hui les principales sources de déforestation en Afrique (Damette & Delacote 2011), l'exploitation forestière, même légale, peut menacer la pérennité de certaines espèces ligneuses (Jennings et al. 2001). En ne ciblant que les tiges bien conformées parmi un nombre très restreint d'espèces commerciales, elle réduit les populations de semenciers, ce qui pourrait affecter à long terme la diversité génétique et les capacités de régénération des espèces concernées. La gestion durable de ces espèces commerciales demande une bonne connaissance de leur autécologie, des éléments clés de la dynamique de leurs populations et de leur histoire évolutive ayant pu amener à la distribution spatiale, à l'abondance et la structuration de la diversité génétique des populations intraspécifiques. A travers l'exemple de l'iroko, l'un des principaux arbres commerciaux de l'Afrique, nous illustrons le niveau insuffisant de connaissances actuelles sur ces espèces en mettant particulièrement en évidence les aspects botaniques, écologiques et génétiques fondamentalement importants pour un aménagement durable intégré, ou la conservation de ces ressources (Sheil & Van Heist 2000; Szaro et al. 2005).

L'appellation "iroko" désigne les deux espèces du genre *Milicia*: *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg et *M. regia* (A. Chev.) C.C. Berg, très semblables sur le plan morphologique (Ofori et al. 2003). Les premières traces écrites de l'utilisation de l'iroko en Europe datent du début du XIX^e siècle (Mauriès 1970): alors dénommé African oak, l'iroko était importé par les Anglais et servait dans la construction navale. L'importation de ce bois ne prit toutefois de l'ampleur en Europe que vers 1913. L'importance du bois d'iroko fut telle que l'arbre fit l'objet d'études sylvicoles très tôt, et une monographie lui fut consacrée au cours de la première moitié du XX^e siècle (Tondeur 1939). Très tôt, l'iroko s'est toutefois avéré sensible aux rythmes d'exploitation pratiqués dans certains pays, au point qu'une réduction sensible de ses effectifs ait été signalée localement (Hawthorne 1995; Joker 2002), provoquant l'instauration de mesures particulières d'exploitation ou de commercialisation de ce bois.

Bien que l'importance économique de l'iroko ait suscité de nombreuses études scientifiques, celles-ci demeurent fragmentaires et n'ont principalement été menées que dans des pays d'Afrique de l'Ouest et de l'Est (Ebert 2004; Ofori 2007a,b). Outre l'objectif global de proposer une revue bibliographique actualisée des *Milicia*, le présent document cherche surtout à relever les thématiques méritant davantage d'efforts de recherche dans un souci d'exploitation et d'aménagement durables des populations des deux espèces. Dans la suite du document, le terme "iroko" désigne les deux taxons, tandis que nous préciserons le nom latin d'une des deux espèces si l'information ne se rapporte qu'à elle seule.

3.2. Distribution géographique et principales caractéristiques de l'arbre

L'iroko a une large distribution sur le continent africain, allant de la Guinée Bissau à l'Éthiopie et jusqu'en Angola et au Zimbabwe en direction du Sud. Toutefois l'espèce *M. regia*, elle, aurait une distribution plus

limitée, se confinant du Sénégal au Ghana (Berg 1977). L'iroko est rencontré dans les forêts sempervirentes et semi-décidues, voire dans des forêts galeries en savanes (Nichols et al. 1998).

L'arbre atteint une hauteur maximale de 45 à 50 m pour un diamètre de l'ordre de 2,5 m (Ofori 2007a). L'écorce a une teinte allant du gris au brun foncé, et présente des lenticelles jaunâtres. Le tronc cylindrique et généralement droit, est dépourvu de branches sur une hauteur de 15 à 30 m. Il possède parfois de faibles empattements à sa base et exsude abondamment un latex blanc jaunâtre lorsqu'il est entaillé. Chez les arbres adultes, les racines sont souvent superficielles et proéminentes. La cime a une forme étalée, avec des branches obliquement ascendantes. Les feuilles, simples et alternes, sont de forme elliptique à oblongue, mesurant 6 à 20 cm de long pour 4 à 10 cm de large.

Si les grands traits morphologiques sont identiques entre les deux taxons au point qu'ils aient été et soient encore couramment confondus (Engler 1894; Chevalier 1912; Ofori et al. 2003), certaines caractéristiques végétatives et reproductrices peu faciles à appréhender, différencieraient significativement entre *M. excelsa* et *M. regia* (Berg 1977; Hawthorne & Jongkind 2006).

3.3. Le débat phylogénétique autour de l'iroko: une ou deux espèces de *Milicia*?

3.3.1. L'origine du débat

En 1869, Welwitsch décrit l'espèce *Morus africana*, observée dans les forêts primaires de l'Angola. Quelques années plus tard, l'espèce est successivement transférée dans le genre *Maclura* Nutt. (Bureau 1873), puis dans *Chlorophora* Gaudich par Benth. & Hooker (1880). *Chlorophora* comprenait alors deux espèces: l'arbre américain *C. tinctoria* (L.) Benth. & Hook. et *C. excelsa* (Welw.) Benth. & Hook. Par la suite, plusieurs autres espèces furent incluses dans ce genre: *C. tenuifolia* (Engler 1894), *C. alba* et *C. regia* (Chevalier 1912). De ces trois nouvelles descriptions, seule *C. regia* a été confirmée par d'autres botanistes comme étant probablement une nouvelle espèce (Rendle 1916; Aubréville 1959; Berg 1977). A noter que deux autres espèces malgaches (*C. greveana* et *C. humbertii*) furent aussi ajoutées à la liste des *Chlorophora*: (Léandri 1948), mais elles furent transférées ultérieurement dans les genres *Allaeanthus* Thw. (Capuron 1968) et *Broussonetia* Vent. (Berg 1977).

Le genre *Milicia* fut proposé pour la première fois par Sim (1909) pour deux espèces: *Milicia africana*, et *M. spinosa*. Rendle (1916) puis Berg (1977) confirmèrent par la suite qu'il s'agissait de *Chlorophora*. En 1982, Berg C.C. publia une analyse critique des genres *Maclura*, *Chlorophora* et *Milicia*. Il y concluait d'une part que le genre *Chlorophora* pouvait être inclus dans le vaste genre *Maclura*, et d'autre part, que les deux espèces africaines de *Chlorophora* différaient notablement de *C. tinctoria* (américain). L'auteur proposa alors que les *Chlorophora* africains (*C. regia* et *C. excelsa*) soient placés dans le genre *Milicia*. Les dénominations *M. excelsa* et *M. regia* sont actuellement les plus répandues et aucune autre analyse critique des liens phylogénétiques au sein des genres *Chlorophora* et *Milicia* n'a plus été menée. A noter que Sim n'ayant jamais fourni ou désigné un lectotype des *Milicia* qu'il avait décrits, ce nom a pu être approprié par Berg (1982).

Le débat aurait pu être clos si la différenciation botanique entre les deux *Milicia* n'était pas si faible, générant des confusions parmi des botanistes confirmés (Ofori et al. 2003). A titre d'exemple, bien qu'il ait fourni des descriptions botaniques exemplaires montrant des différences entre les deux espèces, Chevalier (1917) estimait que l'iroko commun dans la forêt gabonaise du Bas-Ogooué correspondrait à *M. regia*, même si *M. excelsa*

devrait y exister aussi. Cette appréciation était sans doute basée sur l'hypothèse que *M. regia* serait davantage fréquente que *M. excelsa* dans les forêts denses très humides, car c'est cette dernière qui est décrite actuellement comme seule espèce d'iroko au Gabon (Berg et al. 1984; White & Abernethy 1996; Doucet 2003). Par ailleurs, l'un des spécimens décrits par Chavelier (1912) comme étant *C. regia* provient du Nord du Bénin, pays qui n'abriterait que *M. excelsa* (White 1966). Ofori (2007b) signale aussi que *M. regia* est présente au Nigéria, mais y aurait été introduite via des provenances de la Sierra Leone. Dans les régions où sont présentes les deux espèces, les forestiers ne font aucune distinction entre elles, leurs bois étant très similaires (White 1966; Ofori 2007a).

3.3.2. Quelles différences morpho-botaniques entre les deux espèces?

Le tableau 1 résume les caractéristiques botaniques pouvant servir à distinguer les deux espèces. Selon plusieurs auteurs, les caractéristiques foliaires sont les traits les plus utiles pour distinguer les deux taxons (Aubréville 1959; Berg 1977; Nyong'o et al. 1994; Hawthorne & Jongkind 2006): non seulement ces feuilles seraient de formes assez dissemblables pour un œil exercé, mais surtout, elles présenteraient différentes nervations. Le nombre de nervures secondaires chez *M. regia* n'excéderait pas 11 paires, tandis qu'il varierait de 12 à 22 paires chez *M. excelsa*. De plus, à l'aide d'une bonne loupe, il serait possible de distinguer des poils courts entre les nervilles de cette dernière, *M. regia* étant généralement glabre. On notera aussi que la disposition des feuilles chez les juvéniles différerait d'une espèce à l'autre selon Berg (1977): les feuilles sont placées dans un même espace plan chez *M. regia*, tandis qu'elles forment une spirale chez *M. excelsa*. Par ailleurs, *M. excelsa* présenterait un calice avec un collier dense de poils raides à la base, structure absente chez *M. regia*. Cette caractéristique est toutefois ardue à vérifier au quotidien, du fait des petites dimensions des organes floraux, mais aussi de par la difficulté à obtenir simplement de tels organes, la floraison étant très éphémère chez l'iroko (Nyong'o et al. 1994).

Certains critères distinctifs seraient critiquables. Ainsi, les dimensions des infructescences ne devraient pas être d'une grande utilité pour distinguer les deux espèces (Aubréville 1959) en dépit des observations de Berg (1977) à ce sujet. Plusieurs sources rapportent des différences de couleur du duramen chez l'iroko, et ces variations avaient été associées soit aux espèces (Chevalier 1917; Aubréville 1959), soit au sexe des arbres (White 1966), l'iroko étant dioïque. Selon White (1966) et GERDAT (1973), il n'y aurait pas de corrélation entre d'une part l'espèce, les conditions de l'habitat ou le sexe de l'arbre, et la couleur plus ou moins foncée du bois d'autre part.

Sur la base de ces observations, on peut légitimement se poser des questions sur la pertinence de ces critères botaniques comme preuves de spéciation. Sur le plan biologique, la spéciation suppose l'existence d'une barrière reproductive (partielle ou totale) entre deux espèces voisines, grâce entre autres à l'incompatibilité de certaines caractéristiques phénologiques, florales ou physiologiques (Koffi 2010). En dehors de la seule présence de poils autour du calice de *M. excelsa* (mais cela peut-il être un frein à la pollinisation entre les deux taxons?), les fleurs et fruits des deux espèces sont fort similaires et elles fleurissent durant la même période (Nyong'o et al. 1994). Les tests d'aptitudes reproductives interspécifiques étant particulièrement ardu à mener chez les arbres, de telles questions peuvent être aujourd'hui résolues à l'aide des marqueurs moléculaires, reconnus comme étant des outils performants de délimitation taxonomique (Duminil & Di Michele 2009).

Tableau 1. Caractéristiques botaniques utilisables pour distinguer *M. excelsa* de *M. regia*.

Trait morphologique	<i>Milicia regia</i>	<i>Milicia excelsa</i>	Source de l'information
Feuilles	Couronne plus large, mais ronde et vert foncée	Couronne plus petite, avec un sommet aplati (pyramide renversée), vert clair	Nyong'o et al. 1994
	Feuille large et plutôt ronde (longueur / largeur = 1,4/1) - Limbe profondément cordé	Feuille longue et assez étroite (longueur / largeur = 1,7/1) - Limbe oblong ou à peine cordé	Chevalier (1917) - Aubréville (1959) - Nyong'o et al. (1994)
	Feuilles alternes vert foncé, dures et ternes - Absolument glabres en-dessous, sauf quelques poils sur les nervures principales	Feuilles alternes vert clair, avec une pubescence très fine sur la face inférieure, à l'aspect velouté, douces au toucher, y compris chez les vieilles feuilles	Chevalier (1917) - Aubréville (1959) - Berg (1977) - Nyong'o et al. (1994) - Hawthorne et Jongkind (2006)
	6 à 11 paires de nervures secondaires	12 à 22 paires de nervures secondaires	
	Nervation sur la face inférieure finement réticulée, avec des nervilles saillantes - L'espace inter-nervilles est vert-pâle et assez plat	Nervation sur la face inférieure avec des aréoles rondes, crevassées et présentant de nombreux petits poils - Les nervilles sont non-saillantes	
	Pétiole court: 1 à 3 cm	Pétiole long: 3 à 5 cm	Nyong'o et al. (1994)
Particularités foliaires chez les juvéniles	Croissance monopodiale et feuilles en spirale	Croissance sympodiale et feuilles disposées en deux rangées	Berg (1977)
	Nervure principale rouge	Nervure principale jaune	
Bois	Duramen blanc jaunâtre?	Duramen jaune brun?	Aubréville (1959) - Chevalier (1917)
	Pas de différence de couleur, ni des propriétés mécaniques		White (1966)
	Densité: 560 - 710 kg/m ³	Densité: 550 à 750 kg/m ³	Ofori (2007a,b)
Inflorescences	Pas de différences entre fleurs mâles: calice blanc, long de 1,5 à 2 mm, densément tomenteux à 4 lobes ovés deltoïdes. Inflorescences atteignant 20 cm de long.		Aubréville (1959) - Berg (1977)
	Inflorescences mâles longues de 13 cm en moyenne	Inflorescences mâles longues de 17 cm en moyenne	Nyong'o et al. (1994)
	Calice des fleurs femelles: entouré ou non à la base de quelques poils	Calice des fleurs femelles: entouré à la base d'une collerette dense de longs poils raides	Aubréville (1959) - Berg (1977)
	4 sépales charnus ovés (≈ 2 mm), concaves, très épais vers le sommet, garnis de poils courts et raides sur la moitié supérieure	4 sépales charnus oblongs (≈ 3 mm), concaves, très épais vers le sommet, garnis de poils courts et raides sur la moitié supérieure	
	Ovaire glabre, sessile, style très oblique	Ovaire glabre, atténué à la base, substipité, surmonté d'un style inséré un peu obliquement	
Infructescences	En grappe de 2 à 3 unités	Solitaires	Nyong'o et al. (1994)
	Dimensions: 8 cm x 1,2 cm	Dimensions: 3 à 5 cm x 1,5 cm	Berg (1977)
	Pas de différences entre les infructescences des deux espèces		Aubréville (1959)

3.3.3. Que nous apprennent les études génétiques sur ces deux espèces?

A l'heure actuelle, il n'existe que deux études qui aient tenté de distinguer génétiquement les deux espèces, et ce, dans une très faible mesure. Ouinsavi et al. (2006) ont été les premiers à développer des marqueurs

microsatellites spécifiques aux deux espèces, mais ils ne donnèrent que des valeurs du taux d'hétérozygotie, qui pourrait être un peu plus faible chez *M. excelsa* que chez *M. regia*. Ces données ne peuvent servir à caractériser les deux espèces car les différences n'ont pas été statistiquement testées. Par ailleurs, leurs résultats proviennent d'échantillons non représentatifs: 30 individus de *M. excelsa* et 10 de *M. regia* issus de deux pays.

Sur la base d'un seul marqueur microsatellite chloroplastique, Ofori et al. (2003) ont pu mettre en évidence trois haplotypes. Ils ont ensuite proposé une association entre ces haplotypes et les deux espèces. Les associations établies sont critiquables dans la mesure où les individus génotypés n'avaient pas été préalablement identifiés comme appartenant à une espèce précise. En effet, du fait des difficultés de distinction morphologique, l'hypothèse de base de l'étude était que les accessions issues des forêts denses sempervirentes correspondaient à *M. regia* tandis que celles prélevées dans les forêts semi-décidues étaient des *M. excelsa*. De plus, un seul de ces trois haplotypes s'est avéré spécifique d'un type forestier bien précis (les forêts semi-décidues). Ensuite, sur la base de marqueurs de type ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), la même étude a révélé une distance génétique 1,5 fois plus grande entre les populations des deux types forestiers qu'au sein de chaque formation végétale. Mais une fois de plus, cet écart génétique n'a pas été statistiquement testé.

En somme, ces études ne permettent de tirer aucune conclusion quant au niveau de différenciation des deux taxons. De plus, la question de l'hybridation n'a jamais été abordée alors qu'elle est fortement suspectée (Nichols et al. 1998; Joker 2002). Or, étudier les liens phylogénétiques entre deux espèces si proches aurait un intérêt certain pour la conservation de l'iroko. En effet, *M. regia* est considérée comme "vulnérable" par l'IUCN tandis que *M. excelsa* est reprise dans la catégorie "presque menacée" (www.redlist.org). S'il s'avérait que les deux taxons sont suffisamment proches au point que leurs hybrides soient fertiles sur le long terme, ce seraient les stratégies de conservation et d'aménagement proposées pour les populations d'iroko d'Afrique de l'Ouest par Ofori & Cobbinah (2007) qui devraient être revues: la disponibilité de la ressource devra être reconsidérée.

3.4. Importance socio-économique de l'iroko

3.4.1. Le bois d'iroko dans le commerce international

Le seul matériau faisant l'objet d'un commerce international chez l'iroko est le bois, indistinct entre les deux espèces (tableau 1; White 1966; GERDAT 1973; Hawthorne 1995).

A l'état frais, le bois parfait d'iroko est brun-jaune tandis que l'aubier tend vers une teinte blanchâtre. En vieillissant à l'air libre, le bois de cœur brunit de façon plus ou moins marquée et prend alors un aspect de vieux chêne avec des nuances dorées (Gérard et al. 1998). Il se sèche bien à l'air ou en séchoir; une fois séché, il bouge peu en service (Ofori 2007a). Le grain est moyen à grossier avec des traces de vaisseaux très apparentes et creuses. Le bois est mi-lourd et mi-dur, avec une densité moyenne de l'ordre de 0,550 à 0,760 à 15% d'humidité (Gérard et al. 1998). Au point de vue des propriétés mécaniques, on compare souvent l'iroko au chêne, mais il est plus voisin encore du teck (Tondeur 1939; GERDAT 1973). Le bois est considéré comme non imprégnable (classe d'imprégnabilité 4) et a une bonne résistance vis-à-vis des champignons de pourriture, des termites, des attaques de *Lyctus* spp. et des térébrants marins (Gérard et al. 1998; Ofori 2007a). C'est un bois durable à très durable qui résiste également bien aux acides et bases (classes de durabilité I et II; ATIBT 1986). Il peut ainsi être utilisé sans traitement de préservation dans les emplois où un risque de réhumidification fréquente existe

(Gérard et al. 1998), et Sen et al. (2009) précisent qu'il fait partie des bois tropicaux les plus résistants en conditions d'immersion marine permanente (pendant un an).

Le bois d'iroko est ainsi employé en agencements et menuiseries d'intérieur et d'extérieur, en construction navale (pont et boiserie intérieure des navires) et charpenterie marine, pour les traverses de chemin de fer, les charpentes, les paillasses de laboratoire, l'ébénisterie, la parqueterie, les planches profilées pour la décoration et la charpente (ATIBT 1986; Ofori 2007a). Il peut être aussi utilisé en placages tranchés mais rarement en placages déroulés (Ofori 2007a).

La production moyenne annuelle de bois d'iroko par les cinq principaux exportateurs de l'Afrique Centrale (Cameroun, Gabon, R.D. du Congo, République du Congo et République Centrafricaine) a été d'environ 138.000 m³ en 2007 et 2008 (ATIBT 2010). En fonction de l'année, l'iroko fait partie des trois à six essences les plus exploitées dans quatre de ces pays, et les principaux importateurs européens sont: le Royaume Uni, l'Allemagne, le Portugal, la France, l'Espagne et l'Italie. Globalement, les exportations de grumes et de sciages d'iroko ont sensiblement diminué au cours des dernières décennies (Ofori 2007a). Afin de réduire la menace de raréfaction à long terme, certains pays producteurs ont pris des mesures censées limiter la production de bois d'iroko:

- i. *M. regia* est "légalement protégé" en Gambie (Ofori 2007b);
- ii. un permis spécial est exigé pour son exploitation au Ghana, en Tanzanie, en Côte d'Ivoire et en Mozambique (WCMC 1998; Ofori 2007a);
- iii. son exploitation a été récemment interdite officiellement en Ouganda, bien qu'il continue de faire l'objet d'un commerce illégal entre ce pays et le Kenya (Ebert 2004);
- iv. les bois indigènes, dont l'iroko, sont interdits d'exploitation au Kenya par un décret présidentiel (WCMC 1998);
- v. l'Etat d'Oyo au Nigéria a instauré un moratoire de 10 ans sur l'exploitation de l'iroko (WCMC 1998).

Il est à noter aussi que des pays tels que le Ghana, la Tanzanie, la Côte d'Ivoire, le Gabon et le Cameroun interdisent l'exportation des grumes; seuls les sciages sont autorisés à cette fin (WCMC 1998; Ofori 2007a).

3.4.2. Les perceptions locales de l'iroko

Certaines ethnies d'Afrique de l'Ouest et de l'Est en Côte d'Ivoire, au Togo, au Bénin, au Nigéria et en Ouganda considèrent l'iroko, tout comme le fromager (*Ceiba pentandra* L. Gaertn.), comme un arbre qui abrite des génies ou des sorciers (Mollet et al. 2000; Azonkponon 2001; Tabuti 2007). Ces croyances autour de l'iroko ont contribué à sa conservation dans la mesure où elles engendrent la sacralisation de nombreux arbres (Mollet et al. 2000).

D'un autre côté, une multitude de remèdes, breuvages et produits d'alimentation sont dérivés de différentes parties de l'arbre (tableau 2). La fonction galactogène est sans doute la plus citée dans la zone de distribution de l'iroko. Il est à noter aussi que *Milicia* est fréquemment maintenue dans les champs en général, et dans les cacaoyères en particulier afin de fournir l'ombrage nécessaire à cette spéculation tout en offrant les autres services mentionnés dans le tableau 2 (Mollet et al. 1995).

Par ses vertus commerciales, magico-religieuses, médicinales et agronomiques, le savoir rural autour de cet arbre est non négligeable. Ce savoir a été renforcé au cours des dernières décennies par diverses études écologiques et sylvicoles conduites principalement au Ghana et partiellement en Ouganda.

Tableau 2. Utilisations traditionnelles de l'iroko en Afrique.

Usages	Partie concernée	Pays concernés	Source de l'information
Fabrication de meubles, charpentes, divers outillages	Bois parfait	Dans toute la zone de distribution de l'espèce	Tondeur (1939) - Raponda-Walker & Sillans (1995) - Ofori (2007a)
Bois de service et bois de chauffe	Toute partie ligneuse, selon l'objectif poursuivi	Dans toute la zone de distribution de l'espèce	Tondeur (1939) - Raponda-Walker & Sillans (1995) - Ofori (2007a)
Fabrication de pirogue	Tronc	Gabon	Raponda-Walker & Sillans (1995)
Galactogène : augmentation de la sécrétion lactée des femmes enfantant	Latex Ecorce et feuilles	Bénin Cameroun Gabon Ghana Guinée Bissau Guinée Equatoriale	Akendengué (1992) - Raponda-Walker & Sillans (1995) - Thies (1995) - Ofori (2007a)
Confection de pagnes (anciennement)	Ecorce	Gabon	Raponda-Walker & Sillans (1995)
Elément de fétichisme ou d'idolâtrie interagissant avec les esprits	L'arbre entier	Bénin Côte d'Ivoire Nigéria Ouganda Togo	Mollet (2000) - Azonkponon (2001) - Tabuti (2007)
Alimentation humaine	Fruit	Côte d'Ivoire Ghana	Mollet (2000) - Ofori (2007a)
Soin pour la stérilité chez les femmes	Ecorce	Bénin R. du Congo	Azonkponon (2001) - Nkounkou-Loumpangou et al. (2005)
Soin de la trypanosomiase	Ecorce	Guinée Bissau	Thies (1995)
Divers usages en pharmacopée: aphrodisiaque, tonique, purgatif, contre les affections cutanées et les douleurs au ventre	(non précisées)	Cameroun Ghana Guinée Bissau Ouganda R. du Congo	Thies (1995) - Carrière (2002) - Katumba et al. (2004) - Nkounkou-Loumpangou et al. (2005) - Tabuti (2007)
Divers usages en soins vétérinaires	(non précisées)	Ouganda	Tabuti (2007)

3.5. Reproduction et régénération de l'iroko

La gestion efficace d'une espèce commerciale nécessite une connaissance assez fine de l'écologie de ses populations et en particulier de sa niche de régénération. A l'heure actuelle, la plupart de la documentation existante se rapporte à l'autoécologie et la sylviculture de *M. excelsa*. *M. regia* a été très peu étudiée, probablement parce qu'elle est confondue avec *M. excelsa*, et que sa distribution géographique est plus limitée.

La large distribution de *M. excelsa* ainsi que sa présence et sa persistance dans une grande variété d'habitats témoignent d'un préférendum écologique relativement large (Nichols et al. 1998). Typiquement, les espèces des stades précoces de la succession ou pionnières, telles que l'iroko (Hawthorne 1995) présentent des traits d'histoire de vie et des caractéristiques physiologiques qui en font de bons colonisateurs (Ricklefs & Miller 2005): (i) une production abondante de petites graines, (ii) lesquelles seraient dispersées à large échelle et (iii)

seraient longévives qui plus est (elles seraient dormantes afin d'être intégrées dans la banque de graines du sol); (iv) enfin, la germination donnerait lieu à des plantules se développant vigoureusement afin de limiter les nuisances de la concurrence. Les données actuellement disponibles ne permettent de vérifier ces hypothèses que dans une certaine mesure.

3.5.1. Exigences abiotiques globales

Bien que présentant des distributions essentiellement parapatriques, les deux espèces d'iroko semblent avoir des tolérances écologiques assez distinctes. Mais les informations recensées à ce titre sont peu nombreuses et parfois contradictoires. Il est simplement rapporté que les deux espèces vivent aussi bien en forêt qu'en savane, *M. regia* étant toutefois nettement plus abondante dans les forêts très humides de la bande côtière et *M. excelsa* préférant les formations moins humides et plus ouvertes de l'intérieur des pays (White 1966; Berg 1977; Hawthorne 1995). Toutefois Aubréville (1959) a signalé une forte abondance de *M. regia* dans les galeries forestières et savanes de la Casamance.

En dehors de cette distinction maintes fois reprise par d'autres auteurs, les précisions quant à leurs préférences abiotiques n'ont concerné que *M. excelsa*. Par exemple, une description des deux espèces est fournie par Ofori (2007a,b) mais cet auteur ne donne que les exigences environnementales de *M. excelsa*. Il précise qu'on la trouve normalement à moins de 1.500 m d'altitude (bien qu'elle ait été trouvée à 4.500 m d'altitude sur le mont Kilimandjaro; FAO 1986), sous une température moyenne annuelle comprise entre 25 et 35°C et une pluviométrie de l'ordre de 1.150 à 1.900 mm/an. Mis à part sa rareté sur les sols asphyxiants et inondés, les préférences pédologiques de *M. excelsa* n'ont été guère étudiées. Tandis que Hawthorne (1995) rapporte que l'espèce n'aurait pas de préférence particulière concernant la richesse du sol, Ofori (2007a) estime qu'elle s'installe davantage sur les sols riches (en potassium et en phosphore) et serait de fait une indicatrice de la fertilité des sols.

3.5.2. Les besoins en lumière

L'iroko est décrit comme une héliophile stricte, nécessitant un ensoleillement maximal pour sa croissance, quel que soit le stade de développement considéré (Hawthorne 1995; Ofori 2007a,b). Le caractère "héliophile strict" de *M. excelsa* devrait être toutefois nuancé: Agyeman et al. (1994) rapportent que les meilleurs rythmes de croissance des juvéniles d'iroko s'observent à 42% de la radiation solaire maximale, durant les quatre premiers mois de vie des plantules. Par ailleurs, la survie des juvéniles de 13 mois d'âge ne serait pas affectée par des taux de radiation solaire compris entre 2 et 37% (Nichols et al. 1999). On peut ainsi supposer que des plantules d'iroko puissent persister pendant un certain temps dans les sous-bois forestiers peu denses. Néanmoins, le fait que la régénération naturelle semble plus abondante en milieux ouverts que sous canopée (Tondeur 1939) et que la structure diamétrique soit mieux équilibrée en zones peu fermées (figure 1) tend à attester d'un besoin important en lumière à un stade donné. La période seuil de sa tolérance à l'ombrage demeure toutefois inconnue à l'heure actuelle.

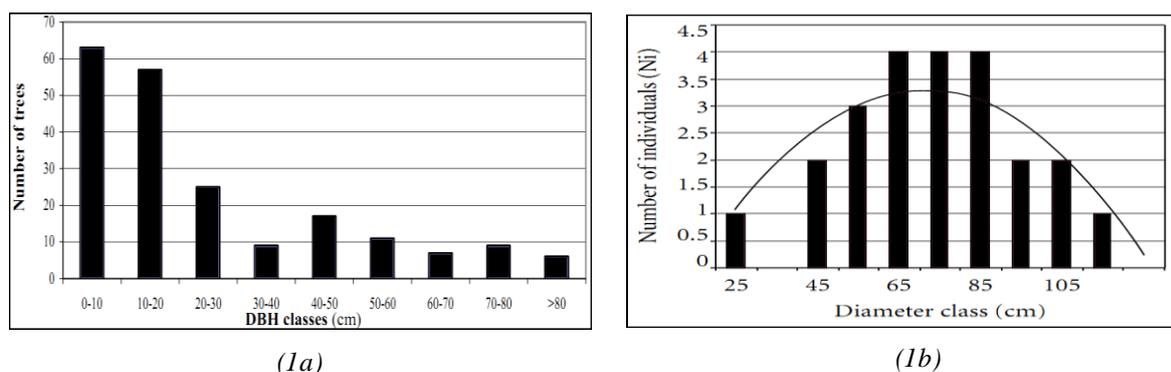


Figure 1. Structure diamétrique de l'iroko: (1a.) dans une zone agroforestière de l'Ouganda (Source: Ebert 2004); (1b) dans une zone forestière du Bénin (source: Ouinsavi & Sokpon 2010).

3.5.3. La disponibilité des diaspores d'iroko dans l'espace et dans le temps

Les perturbations de la voûte forestière surviennent de manière imprévisible, et la disponibilité des diaspores sur de larges étendues et à tout moment de l'année est une stratégie reproductive typique des espèces pionnières (Dalling & Brown 2009). Le seul travail décrivant la phénologie reproductive de l'iroko est celui de Nyong'o et al. (1994), bien que d'autres indices des phénophases puissent provenir de l'analyse des herbiers et descriptions botaniques (Aubréville 1959; Berg 1977; Berg et al. 1984) ou d'observations ponctuelles (Tondeur 1939; Osmaston 1965; Ebert 2004). Globalement, il en ressort que l'iroko tend à fructifier une fois par an vers la fin de la principale saison sèche, et pour une durée n'excédant guère un mois. La production de graines peut être très abondante, même si elle varie fortement d'un arbre à l'autre (Nyong'o et al. 1994). Les paramètres influençant les variations de cette production ne sont pas connus, bien qu'on puisse supposer qu'elle soit régie principalement par:

- i. les caractères génétiques intrinsèques de l'arbre (White et al. 2007);
- ii. la date de floraison et la synchronisation de la floraison entre pieds mâles et femelles (Freitas & Bolmgren 2008);
- iii. la densité de population et l'isolement des individus (Ricklefs & Miller 2005).

Les graines sont petites (environ 2 mm de diamètre) et contenues dans des fruits juteux et sucrés consommés par divers animaux (Osmaston 1965). Les disperseurs de ces semences ont été partiellement étudiés en Afrique de l'Ouest (Okon 1975; Taylor et al. 1999) et en Ouganda (Osmaston 1965). Ces trois études ont montré le principal rôle joué par la chauve-souris *Eidolon helvum* Kerr 1792 dans ces zones, tandis que Aubréville (1959) et Nyong'o et al. (1994) désignaient plutôt des oiseaux comme principaux disperseurs de l'iroko en Afrique de l'Ouest. White & Abernethy (1996) désignent les primates et les oiseaux comme principaux disperseurs au Gabon tandis que Tondeur (1939) signalait l'implication d'antilopes et rongeurs dans cette fonction en R.D. du Congo. Le manque de concordance entre ces récits découle d'observations limitées aussi bien dans le temps que dans l'espace. Il doit être également mis en relation avec la faune localement présente.

L'identification des disperseurs d'une plante demeure néanmoins un élément écologique fondamental à déterminer dans la mesure où l'efficacité de la régénération naturelle et la structure génétique des populations de plantes sont influencées localement par la nature même des disperseurs (Howe & Smallwood 1982). Dans tous

les cas, les animaux potentiellement disperseurs de l'iroko augurent d'une dispersion à grande distance. Dès lors, du fait d'une production abondante de semences et malgré une fructification peu étalée dans le temps, le système de reproduction et de dispersion chez l'iroko optimiserait la probabilité que le recrutement puisse s'établir dans des sites forestiers imprévisiblement favorables (les trouées dans la canopée).

La profusion du recrutement pourrait être renforcée en cas de dormance des graines d'iroko. Hopkins & Graham (1987) et Dalling & Brown (2009) ont par exemple montré que des graines d'espèces pionnières tropicales peuvent demeurer viables dans le sol pendant 2 à 30 ans. Hall & Swaine (1980) ont noté la présence de quelques graines d'iroko dans des échantillons de sols forestiers tropicaux. Bien qu'elle constitue une précieuse indication, cette seule étude ne peut être une preuve du caractère dormant de ces semences, d'autant plus que d'autres travaux rapportent une viabilité semencière nulle après 3 à 6 mois chez cette espèce (Tondeur 1939; Ofori 2007a). De nouvelles études de la composition de la banque de graines du sol pourraient être multipliées afin de vérifier cette hypothèse, mais des tests directs de dormance tégumentaire et, ou physiologique chez les graines d'iroko pourraient également être préconisés.

3.5.4. La dynamique de la régénération naturelle

Par le passé, deux études ont abordé la dynamique de la régénération naturelle de cette essence: Pendje (1994) et Nichols et al. (1999). L'expérimentation de Pendje (1994) a été toutefois réalisée en zone agroforestière et les résultats s'apparentent davantage à ce qui s'observe en plantation. En outre, ces deux études avaient aussi une durée d'observation très limitée dans le temps (maximum 13 mois). De plus, elles n'ont pris en compte que des populations de juvéniles installées à proximité immédiate de semenciers isolés afin de tester aussi l'hypothèse de Janzen-Connell (Ricklefs & Miller 2005). Les résultats de Nichols et al. (1999) montrent que le nombre moyen de plantules par semencier est très faible (6,5 juvéniles par arbre mère). La croissance moyenne en hauteur a été estimée à 4 cm/an après un suivi de 10 mois, et il n'y avait pas de corrélation entre ce paramètre et l'intensité de la radiation solaire. Aucune information n'a été fournie au sujet de la croissance diamétrique ou des taux de recrutement annuels.

Par contre, les données de croissance issues de plantations expérimentales sont davantage abondantes. Le tableau 3 résume les observations répertoriées. Ces données semblent montrer des performances globalement meilleures en plein découvert qu'en sous-bois ou en chablis. La croissance en hauteur notée sur certains sites (Dupuy & Mille 1991; Wagner et al. 2002; Ebert 2004) est élevée et concorde avec les traits des espèces pionnières. L'accroissement diamétrique moyen couramment retenu pour l'iroko est d'environ 5 mm/an, valeur confirmée par des études des cernes de croissance en forêt centrafricaine (Durrieu de Madron 2003). Il faut aussi préciser que les plantations d'iroko sont fortement attaquées par un insecte gallicole *Phytolyma lata* Walker 1852 qui serait responsable de l'échec de nombre d'essais (White 1966). Les meilleures performances enregistrées à ce jour proviennent d'expérimentations agroforestières réalisées en Ouganda et en Tanzanie: l'accroissement annuel moyen en diamètre y variait de 1,6 à 2,1 cm/an pour des arbres âgés de 35 à 75 ans (Ebert 2004). De plus, ces résultats ont montré une relation quasi-linéaire entre l'âge des arbres et leur diamètre (coefficient de détermination $R^2 = 0,84$; $p < 0,01$) contrairement à la tendance notée par Durrieu de Madron (2003) à partir de l'analyse des cernes (croissance diamétrique moyenne significativement plus élevée dans les faibles classes de diamètre).

Tableau 3. Paramètres de dynamique de l'iroko pour quelques essais de plantation.

Type de plantation	Age des plantations (an)	Taux de survie (%)	Accroissement annuel moyen diamétrique (cm/an)	Accroissement annuel moyen en hauteur (cm/an)	Source de l'information
Plantation pure en plein découvert	3	/	0,9	49,1	Duguma et al. (1994) (Cameroun)
	6	23	0,2	28,3	Zaou et al. (1998) (Gabon)
	8	86	1,4	86,3	Dupuy et Mille (1991) (Côte d'Ivoire)
	1,1	87	0,8	83,1	Wagner et al. (2002) (Ghana)
Plantation pure en sous-bois	6	1	0,6	21,7	Zaou et al. (1998) (Gabon)
Plantation mixte (avec <i>Terminalia superba</i>) en chablis forestier	8 - 9	20	0,3	34,3	Bosu et al. (2006) (Ghana)

Les paramètres techniques nécessaires à la modélisation de la dynamique des populations d'iroko sont donc partiellement disponibles en plantation. Ils restent par contre largement déficitaires en conditions naturelles. Or, l'exploitation de cette espèce étant quasi exclusivement confinée aux forêts naturelles, toute généralisation de ces résultats serait critiquable. Par ailleurs, la croissance diamétrique est un trait faiblement à moyennement héritable qui nécessite des estimations locales (White et al. 2007).

3.5.5. Les preuves génétiques et palynologiques du caractère pionnier et colonisateur de l'iroko

Au vu de la préférence de l'iroko pour les milieux ouverts, d'aucuns pourraient s'étonner de sa présence remarquable dans les forêts denses humides Guinéo-Congolaises.

L'expansion des populations d'iroko dans les massifs forestiers denses humides a sans doute été favorisée par les régressions forestières majeures passées. Les études palynologiques effectuées par Maley & Brenac (1998) au Cameroun ont montré que l'importante régression forestière due à la glaciation survenue entre 20.000 et 10.000 ans BP n'a quasiment pas affecté les populations des taxons tels que *Milicia* et *Celtis*. Ceci met aussi en évidence une bonne plasticité climatique chez ces taxons par rapport à d'autres espèces ligneuses caractéristiques des forêts denses. Mieux encore, il ressort de la même étude que les densités de *Milicia* auraient pu s'accroître rapidement et significativement lors de l'expansion forestière subséquente, à la faveur probablement (i) des facteurs climatiques davantage favorables, et (ii) d'une dispersion efficace de grandes quantités de semences. La même tendance colonisatrice a dû se produire au sein des forêts gabonaises lors des régressions enregistrées vers 2.800 ans BP et entre 1.400 et 500 ans BP (Ngomanda et al. 2007; Giresse et al. 2008). Par ailleurs, on sait que les populations humaines locales avaient fortement migré au sein du massif des forêts denses humides d'Afrique Centrale, créant ainsi des conditions propices au maintien des espèces héliophiles, par la pratique de l'agriculture itinérante sur brûlis (Doucet 2003).

Les études génétiques à l'aide de marqueurs moléculaires pourraient renseigner sur l'histoire démographique de l'espèce, et sur la diversité et la structure génétique des populations actuelles (Plana 2004). Les investigations de cet ordre réalisées en Afrique de l'Ouest n'apportent malheureusement que de faibles précisions sur ces sujets (Ofori et al. 2003). Faisant ressortir un niveau de diversité assez bas dans certaines populations, elles n'ont

toutefois pas testé si cela était indicateur de colonisations récentes ou au contraire, de goulots d'étranglement survenant dans ces populations (Cornuet & Luikart 1997).

3.6. Conclusion et recommandations

Malgré une bibliographie assez abondante sur les traits écologiques de l'iroko, de nombreux points demeurent peu ou mal décrits. Alors que des efforts de recherche ont été menés en Afrique de l'Ouest sur *M. excelsa*, l'Afrique Centrale reste largement à la traîne, bien qu'elle constitue aujourd'hui la principale région exploitant cette espèce. Une gestion durable de *M. excelsa* nécessite un approfondissement des connaissances relatives: (i) aux patrons et aux traits d'histoire de vie gouvernant le cycle de reproduction et de régénération de l'espèce; (ii) à l'influence de ces traits de vie sur la diversité génétiques des populations d'iroko, en relation avec les types d'habitats colonisés, et enfin, (iii) aux niveaux de différenciation génétique entre les populations. Pour ce dernier point, la distribution continue de l'espèce à travers une large partie du continent africain suggérerait un flux de gènes important, et donc une faible différenciation, en dépit des longues phases d'aridification climatique et de fragmentation forestière observées tout au long du Quaternaire (de 1,8 millions d'années à aujourd'hui). Si toutefois une structuration génétique spatiale marquée était démontrée, elle mettrait en évidence une capacité de dispersion bien plus limitée qu'attendu, ainsi que le rôle éventuel des refuges forestiers de la période glaciaire dans l'organisation de la diversité.

M. regia a été très négligée jusqu'à présent, et une grande partie de l'information disponible sur l'iroko ne concerne que *M. excelsa*. Fondamentalement, il est déjà surprenant de noter que *M. regia*, pourtant décrite comme un arbre de forêt humide, soit (i) présente au Sénégal, et (ii) absente des forêts denses humides d'Afrique Centrale. Même si le Dahomey Gap a pu limiter sa dispersion, ce couloir climatique sec allant de l'Est du Ghana à l'Est du Bénin ne s'est installé que récemment (vers 4.000 ans BP), à une période où l'espèce aurait déjà dû être présente dans les forêts du Bas-Guinéen. Cela n'est qu'une des nombreuses questions relatives à l'écologie de l'iroko, qui demeurent sans réponse à l'heure actuelle.

4. Caractérisation morphogénétique des populations de *Milicia excelsa* et *M. regia* en Afrique: inférence de la dynamique historique des populations et des évènements d'hybridation entre les deux espèces (Article 2)

Kasso Daïnou, Michaël Pluijgers, Jean-Louis Doucet, Brice Sinsin, Olivier J. Hardy, Grégory Mahy

Article en préparation.

Résumé. L'iroko, comprenant les espèces *Milicia excelsa* et *M. regia*, fait partie des espèces ligneuses tropicales de l'Afrique sub-saharienne à forte valeur commerciale. *M. regia*, décrit comme un taxon préférant les forêts denses humides, a pourtant une distribution limitée à une partie de l'Afrique de l'Ouest. Afin de comprendre les processus historiques, écologiques et biologiques, qui ont pu affecter la dispersion et la structure génétique spatiale de ces deux taxons, nous avons effectué une étude morphogénétique de leurs populations à l'échelle du continent. Les caractères morphologiques utilisés sont d'ordre foliaire, tandis que sept marqueurs nSSR ont servi à la caractérisation de la diversité génétique. Sept pools géniques ont été identifiés au total. Leurs localisations, particulièrement en Afrique Centrale semblent concorder avec l'hypothèse des refuges forestiers, bien qu'aucun gradient de diversité lié à l'éloignement des zones désignées comme refuges, n'ait pu être observé avec les marqueurs nSSR. En Afrique de l'Ouest, la concordance entre l'identité morphologique et l'assignation des individus à des clusters génétiques spécifiques est élevée (95%). La divergence génétique entre les deux espèces est importante, mais elle est du même ordre de grandeur que les niveaux de différenciation entre certaines populations de *M. excelsa* d'Afrique Centrale. *M. regia* présente par ailleurs deux morphotypes correspondant à deux pools génétiques assez distincts. Plusieurs résultats semblent par ailleurs attester l'existence d'hybridation entre *M. excelsa* et *M. regia*. Quant à la distribution géographique limitée de *M. regia*, elle demeure sujette à discussion et ne semble s'expliquer éventuellement que par une origine récente de l'espèce. Une analyse plus approfondie de l'ADN chloroplastique ainsi qu'une caractérisation morphologique approfondie des deux espèces s'imposent pour mieux expliquer les résultats actuels.

Mots-clés: *Milicia excelsa*, *M. regia*, structure génétique spatiale, identité taxonomique, hybridation, refuges forestiers, Afrique tropicale.

4.1. Introduction

L'une des principales causes de la structuration génétique des populations africaines d'espèces arborées est liée à l'histoire naturelle du continent à partir du Miocène (depuis 23 millions d'années; Plana 2004). Depuis des centaines de milliers, voire des millions d'années, la Terre subit des alternances plus ou moins régulières de périodes glaciaires et interglaciaires (Bennett & al. 1991). Au cours des périodes de glaciation, la couverture forestière s'est dramatiquement réduite au profit de flores de savanes et montagnardes (Maley 1996). La flore des forêts de basse altitude ne subsistait alors que dans des zones particulières dénommées refuges forestiers, et situées aux altitudes moyennes des flancs de montagnes ou dans des zones humides. Ces refuges offraient alors des conditions d'aridité moins prononcées que celles notées ailleurs (Plana 2004). Pendant les périodes interglaciaires (retour des conditions climatiques propices à la végétation dense tropicale), les populations végétales réfugiées dans ces zones se sont étendues à nouveau et ont colonisé la région initialement forestière. Ainsi, aux périodes glaciaires et interglaciaires correspondent respectivement des mouvements de régression et d'expansion de la végétation des forêts denses tropicales africaines (Elenga et al. 2004). La fragmentation et l'isolement des populations végétales résultant des oscillations climatiques auraient donc fortement modelé la différenciation intraspécifique, et le long temps de génération des arbres leur aurait permis de conserver les traces de ces événements paléocologiques (Plana 2004; Pennington et al. 2004)

D'une manière globale, différentes études tendent à démontrer que la planète Terre subit actuellement des conditions typiquement interglaciaires (Vande Weghe 2004). Toutefois, et ce depuis quelques siècles, une régression forestière lente, mais marquée, s'observe (FAO 2011). Les causes sont multiples et essentiellement d'origine anthropique: agriculture extensive (Sayer & Maginnis 2005), prélèvement du bois sous toutes ses formes (Roda 2007; Damette & Delacote 2011), conversion accélérée de grands pans forestiers en zones de production de matières premières pour biocombustibles (FAO 2008), toutes choses accrues par les effets des changements climatiques annoncés (Rind 1995). En ce qui concerne particulièrement le bois d'œuvre, l'exploitation forestière en Afrique tropicale peut menacer les populations des espèces commerciales les plus prisées, par un écrémage génétique trop important (Ledig 1992), du fait d'une régénération naturelle insuffisante par rapport aux rythmes de prélèvement (Ofori & Cobbinah 2007), ou simplement parce que les données scientifiques disponibles ne permettent pas d'élaborer des stratégies d'aménagement optimisant les mécanismes naturels de reproduction et de régénération (Szaro et al. 2005). En particulier, dans un contexte de sauvegarde de la biodiversité tropicale, le monitoring écologique des espèces exploitées produirait des outils performants de gestion durable (Szaro et al. 2005; Sheil & Van Heist 2000). Malheureusement, les connaissances écologiques disponibles sont plus qu'insuffisantes pour la grande majorité des espèces commerciales africaines (Forsyth 2005). L'acquisition de telles connaissances est particulièrement pertinente pour les espèces commerciales et celles ayant été longtemps soumises à un commerce soutenu, ou faisant à l'heure actuelle l'objet d'une importante réduction de densité de population. Pour ces dernières, la caractérisation de la diversité génétique intraspécifique est également recommandée car elle s'intègre dans les stratégies d'identification des actions d'aménagement spécifiques (Namkoong et al. 1996). L'exploitation forestière non encadrée, ou simplement les actions anthropiques provoquant la fragmentation et la réduction des populations d'arbres peuvent en effet engendrer une érosion marquée de la diversité génétique. Lorsque cette érosion est rapide, elle se traduit par le phénomène de goulot d'étranglement (ou bottleneck) (Cornuet & Luikart 1996). Si pareille érosion génétique n'induit pas

forcément une spirale d'extinction, elle mérite une attention particulière et la population concernée devrait faire l'objet de mesures de conservation, à titre préventif (Frankham 2005).

La connaissance du niveau de diversité d'une population donnée permet aussi l'estimation des tailles minimum de population susceptibles de maintenir l'intégrité du pool génétique (Weising et al. 2005). D'une façon globale, l'analyse de l'organisation spatiale de la diversité génétique intraspécifique est potentiellement un atout pour la conservation de la biodiversité. Lors de la constitution d'une banque de gènes par exemple, elle évite de dupliquer inutilement des écotypes (populations affichant des adaptations variables en fonction des conditions de leurs milieux) appartenant en réalité au même pool génétique (Hu & Xu 2000).

L'iroko ou *Milicia* spp. est un arbre africain faisant l'objet d'un important flux commercial (ATIBT 2010). Commercialisé officiellement en Europe depuis le début du XIX^e siècle (Mauriès 1970), l'iroko fait partie des cinq espèces ligneuses les plus produites dans la majorité des pays producteurs d'Afrique Centrale. Les rythmes d'exploitation de cette espèce sont telles que certains pays ont commencé à mettre en œuvre des politiques limitant localement sa production (WCMC 1998a; Ofori 2007a,b). L'appellation iroko comprend les deux espèces du genre *Milicia*: *M. regia* (A. Chev) C.C. Berg et *Milicia excelsa* (Welw) C.C. Berg. Si la première est spatialement limitée à une partie de l'Afrique occidentale (du Sénégal au Ghana), *M. excelsa* elle, est présente dans une bonne frange de l'Afrique subsaharienne, et dans une variété d'habitats allant des forêts ripicoles en zones de savane à la forêt dense sempervirente (Ofori 2007a). De ce fait, outre la possibilité de détecter des "perturbations" génétiques d'origine humaine (du fait de l'exploitation et de la fragmentation forestières), *M. excelsa* constitue un modèle biologique idéal pour l'analyse des effets des changements paléo-environnementaux sur la diversité des espèces forestières. Par ailleurs, ces deux espèces sont très proches morphologiquement, et elles s'hybrideraient selon Nichols et al. (1998) et Joker (2002). Aujourd'hui, des marqueurs moléculaires (particulièrement les marqueurs microsatellites) ainsi que les méthodes d'assignation Bayésienne des individus permettent de tester l'hypothèse d'hybridation entre espèces voisines (Duminil et al. 2006; Duminil & Di Michele 2009).

La présente étude a pour but d'analyser l'organisation spatiale de la diversité génétique ainsi que les flux de gènes (de façon indirecte) au sein et entre populations de *Milicia excelsa* et *M. regia*, en relation avec les événements anthropiques et paléoécologiques qui ont pu la façonner. Les perspectives qui en découlent devraient permettre des recommandations en termes de gestion et de conservation des ressources du genre *Milicia*. S'aidant de marqueurs moléculaires neutres, l'étude se propose spécifiquement de: (1) caractériser la différenciation interspécifique, intraspécifique et régionale des populations et d'inférer les événements ayant pu la générer; (2) identifier les populations potentiellement en danger sur la base de leur niveau de diversité et de leur démographie récente; et (3) analyser le niveau de concordance morphogénétique entre les deux taxons. Dans la suite du présent document, le terme "iroko" sera utilisé pour désigner simultanément les deux espèces, tandis que nous spécifierons le nom scientifique lorsque l'information s'adresse à un taxon précis.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Le modèle taxonomique: le genre *Milicia*

Mieux connues sous le nom pilote d'iroko, les deux espèces du genre *Milicia excelsa* (Welw) C.C. Berg et *M. regia* (A. Chev) C.C. Berg font partie des espèces commercialement importantes de la famille des *Moraceae*. Historiquement, Welwitsch (1869) fut le premier à décrire la première espèce d'iroko sous l'appellation *Morus africana*. Elle sera transférée un peu plus tard dans le genre *Chlorophora* (Bentham & Hooker 1880). Trente ans plus tard, Chevalier identifie et décrit la deuxième espèce, lui donnant le nom de *Chlorophora regia* (Berg 1977). Non satisfaisante, la taxonomie des deux espèces sera modifiée à plusieurs reprises jusqu'en 1982, année durant laquelle Berg propose de placer les deux espèces d'iroko dans un genre bien à part: *Milicia* Sim (Berg 1982). Ce genre n'existe qu'en Afrique, et ne comporte à l'heure actuelle que ces deux espèces.

Les deux espèces d'iroko sont très similaires morphologiquement et il n'est pas facile de les distinguer (Hawthorne 1995). Les principaux traits les différenciant sont synthétisés par Daïnou et al. (accepté) (chapitre 3): (1) les feuilles, qui diffèreraient par le nombre de nervures secondaires (≤ 11 paires chez *M. regia*, et > 11 paires chez *M. excelsa*) ainsi que la présence de minuscules poils dans l'espace inter-nervilles exclusivement chez *M. excelsa* (Berg 1977; Hawthorne & Jongkind 2006); (2) la présence d'une collerette de poils denses à la base du calice de *M. excelsa* (Aubréville 1959). Essences héliophiles caducifoliées, les *Milicia* spp. sont considérées comme des espèces pionnières se développant bien dans les forêts secondaires et moins adaptées aux forêts denses fermées (Hawthorne 1995). *Milicia excelsa* et *M. regia* sont toutes deux des espèces dioïques (Berg 1982). A noter d'emblée qu'il n'existe quasiment pas de données écologiques spécifiques à *M. regia*.

La pollinisation se fait par le vent (Joker 2002). Selon Daïnou et al. (à soumettre; chapitre 7), la chauve-souris *Eidolon helvum* et les perroquets *Psittacus erithacus* et *Agapornis swindernianus* seraient les principaux agents dispersant les diaspores de *M. excelsa*. Le rôle disséminateur des graines d'iroko par *E. helvum* a été également observé dans d'autres régions (Osmaston 1965; Okon 1975; Taylor et al. 1999). L'identité de ces disperseurs suggère une distance de dispersion élevée chez cette espèce, et confère à *M. excelsa* un pouvoir colonisateur important, très probablement à l'origine de sa répartition étendue sur le continent africain (Aubréville 1959).

4.2.2. Collecte des échantillons pour l'analyse génétique

Les échantillons ont été obtenus par deux voies différentes. La première a consisté à effectuer des prélèvements de feuille ou de cambium sur des pieds vivants, lors des missions de terrain dans divers pays d'Afrique. En second point, des échantillons ont été prélevés sur des spécimens du Jardin Botanique de Meise (Belgique). Au total, ce sont 1.360 arbres géoréférencés qui ont été échantillonnés à travers 21 pays (figures S1 et S2, et tableau S1 en annexe 1). De cet effectif, 851 individus ont été retenus pour l'étude morpho-génétique.

4.2.3. Caractérisation taxonomique des individus génotypés

En dehors des individus pour lesquels seul le cambium était disponible, tous les autres spécimens ont été décrits morphologiquement. Le critère floral distinctif (présence ou non de poils à la base des sépales) n'a pu être utilisé, les fleurs étant rarement présentes lors des collectes, y compris dans les spécimens d'herbiers. Seule donc la caractérisation foliaire a été effectuée. Elle a porté sur trois critères quantitatifs et deux critères qualitatifs

susceptibles de différencier les deux espèces: (i) le ratio "largeur / longueur" du limbe (l/L_limb), (ii) le nombre de nervures secondaires (N_nerv), (iii) la distance moyenne entre nervures secondaires (D_nerv), (iv) la présence ou non de cavités pubescentes sur la face inférieure du limbe (Cav_Pub), et (v) l'abondance de poils sur les nervures principale et secondaires ($Poil$). Les spécimens de juvéniles étant faiblement représentés dans l'échantillon et leur morphologie foliaire étant assez différente de celle des adultes, les plantules n'ont pu être incluses dans la caractérisation morphologique.

4.2.4. Génotypage des individus

L'ADN de 851 individus a été extrait à l'aide du DNeasy Plant Mini kit de la firme QIAGEN®. Des fragments de 15 à 25 mg de feuille ou 30 mg de cambium ont été broyés manuellement et refroidis dans de l'azote liquide. L'extraction a été faite en respectant le protocole fourni avec le DNeasy Plant Mini kit. Toutefois, les premiers extraits des échantillons d'herbiers ayant fourni des quantités insuffisantes d'ADN, des modifications ont été apportées aux étapes initiales afin d'améliorer le rendement d'ADN pour ces individus (tableau S2 de l'annexe 1).

Sept marqueurs microsatellites développés par Ouinsavi et al. (2006) ont été utilisés pour le génotypage, après avoir été regroupés en deux "complexes" pour une PCR multiplex. Les deux lots multiplex sont identiques à ceux décrits par Bizoux et al. (2009), à l'exception de Mex69, qui a été exclu car générant souvent des profils difficilement interprétables. L'amplification par PCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur BIOZYM PTC 200. Le volume total de chaque échantillon amplifié était de 25 μ l (12,5, 2,5, 8 et 2 μ l de la solution QIAGEN Multiplex Master Mix, du mélange d'amorces, d'eau, et d'extrait d'ADN, respectivement) et les conditions de la PCR étaient: (i) 15 mn de dénaturation à 95°C, (ii) suivie de 29 cycles de 30 s de dénaturation à 94°C, 90 s d'hybridation à 60°C, et 90 s d'élongation à 72°C, (iii) et enfin, une élongation finale durant 15 mn à 72°C.

La révélation des profils génétiques a été effectuée à l'aide d'un séquenceur ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems). Chaque échantillon comportait 1,5 μ l de produit PCR, 13 μ l de Hi-Di Formamide, 0,2 μ l du standard de taille (le ROX en l'occurrence). Les profils fournis par le séquenceur ont été ensuite analysés et corrigés si nécessaire à l'aide de GENEMAPPER 3.0 (Applied Biosystems). La PCR et la révélation par séquenceur ont été répétées une ou deux fois pour les individus aux profils douteux.

4.2.5. Analyse des données

Discrimination morphologique. Une tentative de classification des individus adultes morphologiquement décrits a été réalisée à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP). Celle-ci a pris en compte les trois paramètres quantitatifs précédemment énoncés: le ratio "largeur / longueur" du limbe (l/L_limb), le nombre de nervures secondaires (N_nerv), et la distance moyenne entre nervures secondaires consécutives (D_nerv). Il a été procédé ensuite à une analyse de la concordance entre la classification issue des données quantitatives et les paramètres qualitatifs. Pour ce faire, la projection des individus sur le plan factoriel de l'ACP a été illustrée par différents symboles tenant compte des combinaisons possibles des modalités des variables qualitatives (deux modalités par variable): (i) individus avec cavités pubescentes et avec une forte abondance de poils sur les nervures, (ii) individus avec cavités pubescentes et avec une faible abondance de poils sur les nervures, (iii) individus sans cavités pubescentes et avec une forte abondance de poils sur les nervures, et (iv) individus sans cavités pubescentes et avec une faible abondance de poils sur les nervures. Dans la mesure où pour certaines des

variables quantitatives, des valeurs étaient manquantes pour de nombreux individus, l'analyse multivariée a porté sur 89 individus d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique Centrale.

Diversité génétique et consanguinité. Une population a été définie comme un groupe d'individus géographiquement proches, mais distants d'au moins 100 km d'un autre groupe. Les groupes avec un effectif < 10 individus ont été exclus de la quantification du niveau de diversité et de consanguinité. Les noms attribués aux populations d'iroko sont soit ceux des villes ou villages les plus proches, soit ceux des pays lorsqu'il n'y avait qu'une population dans le pays. A ces noms, correspondent des codes de trois lettres et chiffres: les deux premiers sont les identifiants du pays, le troisième étant un chiffre unique par pays (tableau 1; tableau S1 en annexe 1).

Les paramètres de diversité et de consanguinité ont été déterminés à l'aide de FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995). Il s'agit: (i) du nombre total d'allèles; (ii) de la richesse allélique R_S ; (iii) de l'hétérozygotie espérée ou attendue H_E ; (iv) de l'écart à la panmixie F_{IS} . La présence d'allèles nuls a été vérifiée à l'aide du logiciel INEst (Chybicki & Burczyk 2009). L'estimateur de la fréquence des allèles nuls utilise ici des modèles prenant en compte aussi bien la possibilité d'existence de consanguinité au sein de la population que celle de présence d'allèles nuls. La fréquence des allèles nuls par locus et par population a été déterminée suivant le modèle de consanguinité individuelle (*individual inbreeding model* ou IIM). INEst fournit également les valeurs de F_{IS} corrigées après "extraction" de l'effet des allèles nuls (F_{IS_corr}).

Analyse de la dynamique démographique récente des populations. La dynamique récente des populations peut être testée par une méthode graphique proposée par Luikart et al. (1998), mais aussi en calculant une statistique T_2 , basée sur le principe que la diminution du nombre d'allèles est plus importante que celle de l'hétérozygotie H_E , dans une population dont l'effectif a été dramatiquement réduit dans un passé récent (environ 12 générations auparavant; Cornuet & Luikart 1996; Piry et al. 1999). La statistique T_2 a été déterminée dans le cas présent en suivant les modèles mutationnels IAM (*infinite allele model*) et SMM (*one-step stepwise mutation model*). Lorsqu'elle est significative, une valeur positive de T_2 révèle un excès d'hétérozygotie - et non d'hétérozygotes - dû à une réduction de l'effectif de population.

Identification des pools géniques et assignation des individus aux clusters. La détermination du nombre de clusters génétiques K (pools géniques) a été faite à l'aide de TESS 2.3.1 (Chen et al. 2007). Ce logiciel présente l'avantage de pouvoir proposer divers regroupements possibles des individus sous l'effet d'une certaine autocorrélation spatiale ψ . Le paramètre ψ nommé "*interaction parameter*" varie de 0 (l'information spatiale n'est pas prise en compte) à 1 (une forte intensité d'autocorrélation spatiale). Le modèle "*no admixture*" étant peu probable dans le cas des populations d'iroko (elles ont une distribution continue; le génome de chaque individu provient donc probablement de différents clusters), seul le mode "*admixture*" a été utilisé lors de la détermination des clusters. Le clustering a été testé d'abord à l'échelle de tout l'échantillon d'iroko disponible, indépendamment du taxon *a priori* associé aux individus. En second lieu, l'identification des clusters a été menée à l'échelle des régions: Afrique de l'Ouest d'une part, et Afrique Centrale d'autre part. La meilleure valeur de K est celle ayant la plus faible valeur du "*deviance information criterion*" (DIC , Chen et al. 2007).

Le logiciel CLUMPP 1.1.1 (Jakobsson & Rosenberg 2007) a été ensuite utilisé pour déterminer les proportions moyennes des génomes individuelles (ou la moyenne des coefficients d'admixture) assignées aux clusters. Un individu était ensuite considéré comme appartenant à un cluster K_i ($i = 1, 2, 3...$) lorsque la part de génome

correspondante q est $\geq 50\%$. Les résultats ont été finalement illustrés graphiquement grâce au logiciel DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004).

Intensité de la différenciation génétique entre clusters ou populations, et causes. Le niveau de différenciation entre les groupes (clusters ou populations) a été estimé par deux paramètres: F_{ST} , qui mesure la différenciation sur la base de l'identité des allèles, obtenu et testé à l'aide de FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995), et R_{ST} (qui tient compte plutôt de l'identité des allèles) calculé et comparé au F_{ST} par SPAGeDI (Hardy & Vekemans 2002). Lorsque $R_{ST} > F_{ST}$, on peut admettre que la différence de taille des allèles compte dans la différenciation, et que l'isolement reproductif entre ces clusters est probablement d'origine ancienne, à condition toutefois que les allèles aient été créés sous le modèle mutationnel dit "pas-à-pas" (*stepwise*) (Hardy et al. 2003).

Une structuration spatiale de la diversité génétique peut résulter également de l'isolement par la distance (IBD). Afin de tester cette hypothèse, il a été procédé à la régression des coefficients de parenté F_{ij} sur les distances logarithmiques $\ln(d_{ij})$ séparant les paires d'individus i et j (Hardy 2003; Vekemans & Hardy 2004). Le coefficient de régression $b_{\ln d}$ attendu en cas d'IBD est négatif et significatif. L'existence d'IBD a été vérifiée au sein et entre clusters en utilisant SPAGeDi 1.3 (Hardy & Vekemans 2002). L'hypothèse nulle (corrélation nulle entre F_{ij} et $\ln(d_{ij})$) a été testée par 10.000 permutations de la position spatiale des individus.

Analyse de l'hybridation entre les deux espèces de *Milicia*. L'existence d'hybrides entre *M. excelsa* et *M. regia* en Afrique de l'Ouest a été évoquée par certains auteurs (Nichols et al. 1998; Joker 2002), mais n'a encore pu être prouvée morphologiquement ni génétiquement. Suivant la démarche utilisée par Duminil et al. (2006), les logiciels TESS 2.3.1 (Chen et al. 2007) et STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) ont été utilisés pour détecter d'éventuels hybrides. Le principe de la démarche est le suivant: les individus issus des espèces "pures" ont des taux d'admixture q extrêmes (ou probabilités d'être assignées à l'une ou l'autre espèce): $q < 10\%$ pour l'espèce 1, et donc $q > 90\%$ pour l'espèce 2, pour $K = 2$ clusters (Barilani et al. 2007; Field et al. 2009). Les individus ayant des valeurs de q intermédiaires seraient probablement des hybrides et les hybrides F1 en particulier auront des valeurs proches de 0,5. Toutefois, dans la mesure où les individus "backcross" ou certains F2 peuvent avoir des valeurs de q très proches de celles des parents purs, il n'est pas rare que cette méthode ne puisse détecter une fraction des hybrides potentiels.

4.3. Résultats

4.3.1. Caractérisation morphologique

A l'échelle du continent, l'ACP a produit deux groupes relativement distincts, déterminés essentiellement par l'axe 1 (61,4% de la variance totale): les arbres de la zone Ouest de l'Afrique occidentale (du Sénégal à la Côte d'Ivoire) se positionnent en une région particulière du plan factoriel, comparativement aux autres irokos, du Bénin jusqu'en l'Afrique Centrale (annexe 1, figure S2).

A l'échelle plus restreinte de l'Afrique de l'Ouest, la répartition des points sur le plan formé des axes 1 (déterminé surtout par la variable N_{nerv} : 45,3% de contribution relative) et 2 (déterminé surtout par le paramètre $1/L_{limb}$: 67,1% de contribution relative) aboutit également à la délimitation de deux groupes majeurs (figure 1). Le premier groupe (G1) est composé uniquement d'irokos possédant des (i) alvéoles pubescentes sur la face inférieure et (ii) très peu de poils sur les nervures principales et secondaires. Le second groupe (G2) est formé

d'individus sans cavités pubescentes et affichant une pilosité marquée sur les nervures principale et secondaires (figure 1). En fait, à l'exception de deux cas, une bonne concordance existe entre les deux variables qualitatives *Cav_pub* et *Poil* (ces variables sont statistiquement liées; $\chi^2 = 80,03$, $df = 1$, $p < 0.0001$). On note également que G1 est composé pour une écrasante majorité d'individus du Bénin et du Nigéria (90%) complétés de quelques uns du Ghana (10%), tandis que G2 est dominé par des irokos du reste de l'Afrique de l'Ouest.

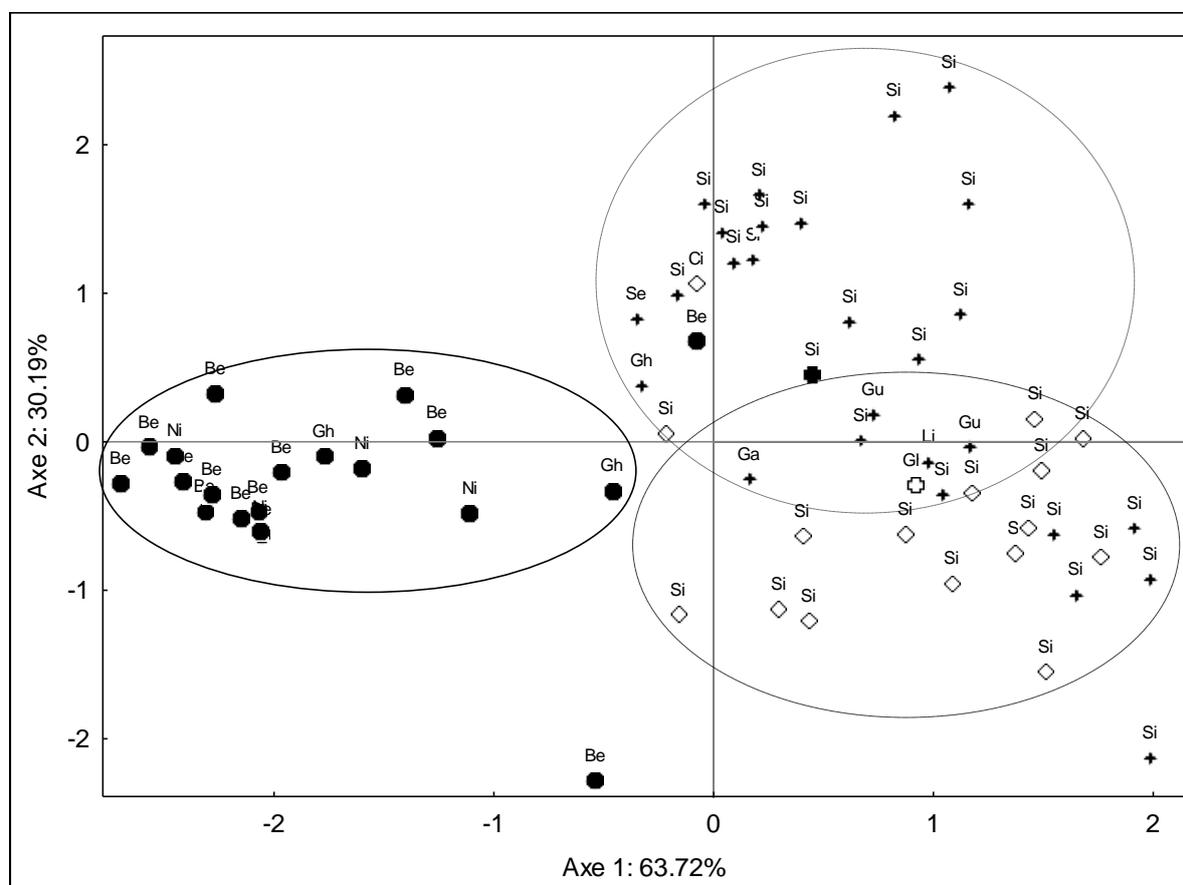


Figure 1. Résultat de l'analyse en composantes principales de trois paramètres quantitatifs foliaires (*VL_limb*, *Nb_nerv*, *D_nerv*) des irokos d'Afrique de l'Ouest. Les points sont identifiés par les pays d'où proviennent les échantillons: Be = Bénin, Gh = Ghana, Ni = Nigéria, Si = Sierra Leone, Gu = Guinée Bissau et Guinée Conakry, Se = Sénégal, Li = Libéria, Ga = Gambie. Les modalités de combinaison des variables qualitatives (*Poil* et *Cav_pub*) et des clusters génétiques sont illustrées par différents symboles de points: disque noir = présence de cavités pubescentes, faible abondance de poils sur les nervures, et assignation au cluster K3; étoile noir = absence de cavités pubescentes, forte abondance de poils et assignation au cluster K1; losange incolore = absence de cavités pubescentes, forte abondance de poils et assignation au cluster K2; croix incolore (1 point) = absence de cavités pubescentes, faible abondance de poils et assignation au cluster K2; croix noire (1 point) = absence de cavités pubescentes, faible abondance de poils et assignation au cluster K1.

Le critère qualitatif *Cav_pub* est celui reconnu par plusieurs auteurs comme discriminatif des espèces *M. excelsa* et *M. regia* (chapitre 3; annexe 1, figure S6; Aubréville 1959; Hawthorne & Jongkind 2006): *M. regia* ne présenterait pas ces cavités pubescentes contrairement à *M. excelsa*. En réalisant une assignation taxonomique des individus sur la base du paramètre *Cav_pub*, les moyennes de chacun des trois critères quantitatifs s'avèrent statistiquement différentes entre les deux taxons (tableau 1). Néanmoins, en considérant les valeurs minimales et

maximales de chaque paramètre (tableau 1), un recouvrement de valeurs existe entre taxons et pour chaque critère: en pratique, aucun de ces critères ne sera donc entièrement fiable pour l'identification de deux taxons. On retiendra en particulier que quatre spécimens de *M. regia*, GK0564, GK0591, GK0677 et KD0332, présentent des valeurs de N_{nerv} compris entre 13 et 15, alors que le nombre maximum proposé par divers auteurs est de 11 chez cette espèce (chapitre 3). A l'échelle de l'espèce *M. excelsa*, il existe également une différence significative entre sous-régions, en ce qui concerne le nombre de nervures secondaires (tableau 1).

Tableau 1. Valeurs moyennes des trois paramètres quantitatifs foliaires. *Min* = minimum; *Max* = maximum. Les lettres *a*, *b* et *c* indiquent les moyennes statistiquement différentes (test ANOVA).

	Nombre moyen de nervures [<i>Min-Max</i>]	Distance moyenne inter-nervures (cm) [<i>Min-Max</i>]	Ratio moyen "largeur / longueur" du limbe [<i>Min-Max</i>]
<i>M. regia</i> (Afr. Ouest)	10,6 ^a [8-15]	1,1 ^a [0,7-1,6]	0,6 ^a [0,4-1,0]
<i>M. excelsa</i> (en Afr. Ouest)	16,7 ^b [13-22]	0,6 ^b [0,3-1,2]	0,7 ^b [0,5-0,9]
<i>M. excelsa</i> (en Afr. Centrale)	14,6 ^c [12-17]	0,7 ^c [0,4-1,2]	0,6 ^a [0,4-0,7]

En basant toujours l'identité taxonomique sur les caractères *Cav_pub* et *Poils*, l'échantillon génotypé se répartirait comme suit: (i) tous les individus d'Afrique Centrale ou d'Afrique de l'Est appartiendraient à *M. excelsa*; (ii) en Afrique de l'Ouest, *M. excelsa* s'étendrait de la Guinée Conakry au Nigéria, tandis que *M. regia* n'aura été détecté que du Sénégal au Ghana (figure S3 en annexe 1).

Chez les plantules, les feuilles sont généralement plus grandes que chez les adultes. La présence de cavités pubescentes ne peut servir d'élément de discrimination entre juvéniles des deux espèces, car ces alvéoles sont invisibles chez les juvéniles récoltés dans la zone de présence exclusive de *M. excelsa* (Afrique Centrale par exemple): la face inférieure du limbe est recouverte d'un tapis dense de long poils (annexe 1, figure S5). Or, ces poils ne sont présents que sur les nervures des jeunes individus trouvés en Sierra Leone par exemple, et qui devraient être associés à *M. regia* (annexe 1, figure S5). En l'état actuel de nos observations, il s'agit là du seul paramètre qui pourrait éventuellement servir à différencier les deux espèces.

4.3.2. Diversité génétique, consanguinité et dynamique démographique à l'échelle du continent

Le tableau 2 présente les valeurs des paramètres de caractérisation de la variabilité génétique au sein des populations. La richesse allélique R_S est en moyenne significativement plus élevée dans les populations d'Afrique de l'Ouest que dans celles d'Afrique Centrale, avec des valeurs comprises entre 3,87 et 5,13 dans la première région contre un maximum de 3,54 en Afrique Centrale (test *T* de Student, $t = 7,25$, $dl = 21$, $p < 0,0001$). Il en est de même pour l'hétérozygotie H_E qui varie entre 0,53 et 0,74 en Afrique de l'Ouest contre 0,43 à 0,53 en Afrique Centrale (test *T* de Student, $t = 6,35$, $dl = 21$, $p < 0,0001$). D'une manière générale, le niveau de diversité semble diminuer de l'Afrique de l'Ouest vers le Sud de la zone d'étude, avec des valeurs intermédiaires au Cameroun. Le Gabon et la R.D. du Congo présentent les niveaux de diversité les plus faibles.

Onze populations présentent des valeurs positives et significatives du F_{IS} . Toutefois, le programme INEst a détecté la présence d'allèles nuls dans chaque population et pour divers marqueurs: leurs fréquences maximales varient de 0,18 à 0,34 en fonction des marqueurs (tableau S3 en annexe 1). Quant aux valeurs de T_2 , elles ne peuvent être interprétées, les résultats variant fortement suivant le modèle mutationnel utilisé.

Tableau 2. Paramètres de diversité génétique au sein des populations d'iroko. N = effectif des populations; Espèce "R" = *M. regia*; Espèce "E" = *M. excelsa*; D_{ij} max = distance entre les individus extrêmes de la population; R_S = richesse allélique basée sur des sous-échantillons de 9 individus et son erreur standard (SE); H_E = hétérozygotie et son erreur standard (SE); F_{IS} = déficit d'hétérozygotes; $F_{IS,corr}$ = déficit d'hétérozygotes corrigé par INEst et son erreur standard (SE); T_2 = coefficient de goulot d'étranglement, déterminé sous les modèles mutationnels SMM et IAM; ns = non significatif, * = significatif, ** = hautement significatif, *** = très hautement significatif.

	Pays	Code population	Nom de population	N	Es pèces (R ou E)	D_{ij} max (km)	Nb allèles	R_S (SE)	H_E (SE)	F_{IS}	$F_{IS,corr}$ (SE)	T_2 / IAM	T_2 / SMM
Afrique de l'Ouest	Sierra Leone	SL-1	Sileti	39	R	46	33	3,927 (0,190)	0,684 (0,015)	0,149**	0,010 (0,012)	3,286 **	1,488 ns
	Guinée Conakry	GC-1	Guinée Conakry	11	R et E	130	28	3,865 (0,543)	0,602 (0,070)	0,061 ns	0,018 (0,023)	1,884*	0,509 ns
	Côte d'Ivoire	CI-1	Côte d'Ivoire	23	R et E	558	39	4,331 (0,324)	0,646 (0,033)	0,254***	0,020 (0,024)	1,415 ns	-1,674 *
	Ghana	GH-1	Ghana	12	R et E	263	38	5,127 (0,463)	0,741 (0,034)	0,137*	0,020 (0,025)	2,030 *	0,204 ns
	Bénin	BE-1	Bénin	40	E	511	44	4,202 (0,259)	0,597 (0,027)	0,029 ns	0,014 (0,015)	0,441 ns	-4,375 ***
	Nigéria	NI-1	Nigéria	14	E	133	32	4,069 (0,506)	0,526 (0,058)	-0,029 ns	0,013 (0,018)	-0,169 ns	-2,915 *
Afrique Centrale	Cameroun	CA-1	Gundi	15	E	71	27	3,324 (0,330)	0,471 (0,057)	0,165*	0,031 (0,037)	-0,378 ns	-3,157 ***
		CA-2	Megan	10	E	55	20	2,828 (0,417)	0,473 (0,077)	0,053 ns	0,025 (0,033)	1,675 *	0,466 ns
		CA-3	Belabo	78	E	39	37	3,459 (0,112)	0,513 (0,016)	0,167***	0,018 (0,016)	0,450 ns	-4,874 ***
		CA-4	Belabo-Mindourou	10	E	65	24	3,369 (0,301)	0,530 (0,046)	0,116 ns	0,025 (0,032)	0,427 ns	-1,360 ns
		CA-5	Mindourou	113	E	55	37	3,366 (0,084)	0,519 (0,010)	0,099***	0,020 (0,018)	0,867 ns	-4,480 ***
		CA-6	Biyeyem	51	E	77	38	3,455 (0,131)	0,495 (0,018)	0,197***	0,017 (0,020)	0,323 ns	-6,364 ***
		CA-7	Djourn	55	E	166	35	3,109 (0,146)	0,473 (0,024)	0,234***	0,022 (0,024)	-0,188 ns	-5,474 ***
		CA-8	Makalaya	18	E	30	29	3,538 (0,265)	0,573 (0,022)	0,058 ns	0,023 (0,026)	0,988 ns	-1,634 ns
		CA-9	Yokadouma-Moloundou	12	E	167	24	3,187 (0,279)	0,478 (0,048)	0,028 ns	0,020 (0,026)	0,030 ns	-2,026 *
	Centrafrique	CE-1	Centrafrique	48	E	8	30	2,890 (0,146)	0,438 (0,030)	0,005 ns	0,011 (0,012)	-0,047 ns	-3,675 **
	R. du Congo	CO-1	Ipendja	21	E	9	25	2,955 (0,173)	0,485 (0,039)	0,094 ns	0,021 (0,025)	0,748 ns	-1,389 ns
	Gabon	GA-1	Libreville	19	E	75	20	2,622 (0,225)	0,471 (0,049)	0,025 ns	0,018 (0,021)	2,166 *	0,619 ns
		GA-2	Ekarlong	11	E	83	21	2,888 (0,261)	0,506 (0,042)	0,153 ns	0,033 (0,042)	1,195 ns	-0,522 ns
		GA-3	Lastourville	53	E	90	27	2,925 (0,122)	0,433 (0,026)	0,183***	0,021 (0,023)	0,623 ns	-2,753 *
	R.D. du Congo	RC-1	Luki	45	E	3,3	25	2,708 (0,191)	0,426 (0,036)	0,082*	0,019 (0,021)	1,590 ns	-1,018 ns
RC-2		Kinduala	49	E	1,7	26	2,810 (0,120)	0,476 (0,025)	-0,015 ns	0,012 (0,013)	1,496 ns	-1,228 ns	
RC-3		Yangambi	36	E	108	29	3,123 (0,211)	0,499 (0,028)	0,086*	0,023 (0,025)	1,201 ns	-1,860 *	

4.3.3. Structure génétique à l'échelle du continent

En mode admixture, la meilleure probabilité est obtenue pour $K = 5$ clusters. Le tableau 3 montre les résultats d'assignation des individus et populations à ces clusters.

Tableau 3. Assignation des populations aux clusters et pourcentage d'individus concernés par population. N = effectif des populations.

	Pays	Code de la population	Nom de la population	N	Proportion du génome moyen individuel assigné à chaque cluster					Cluster principal	% d'individus assignés au cluster principal ($q > 0.50$)	
					K1	K2	K3	K4	K5			
Afrique de l'Ouest	Gambie-Sénégal	GS-1	Gambie-Sénégal	6	0,87	0,08	0,04	0,01		1	100,0	
	Guinée Bissau	GB-1	Guinée Bissau isolé	1	0,99		0,01			1	100,0	
	Sierra Leone	SL-1	Sileti	39	0,94	0,03	0,01	0,02		1	100,0	
		SL-3	Sierra Leone isolé	1	0,71	0,09	0,08	0,09	0,03	1	100,0	
	Guinée Conakry	GC-1	Guinée Conakry	11	0,58	0,22	0,10	0,06	0,04	1	72,7	
	Libéria	LI-1	Libéria isolé	1	0,78	0,16	0,03	0,02	0,01	1	100,0	
	Côte d'Ivoire	CI-1	Côte d'Ivoire	23	0,69	0,21	0,03	0,06	0,01	1	78,3	
	Ghana	GH-1	Ghana	12	0,39	0,55	0,04	0,01	0,01	2	58,3	
	Bénin	BE-1	Bénin	40	0,01	0,80	0,12	0,03	0,03	2	95,0	
	Nigéria	NI-1	Nigéria	14	0,02	0,53	0,38	0,02	0,04	2	50,0	
Afrique Centrale	Cameroun	CA-1	Gundi	15		0,03	0,82	0,13	0,01	3	86,7	
		CA-2	Megan	10		0,02	0,89	0,08	0,01	3	90,0	
		CA-3	Belabo	78		0,02	0,87	0,09	0,01	3	96,2	
		CA-4	Belabo-Mindourou	10		0,01	0,84	0,13	0,02	3	100,0	
		CA-5	Mindourou	113		0,02	0,84	0,11	0,03	3	92,9	
		CA-6	Biyeyem	51	0,01	0,01	0,75	0,17	0,06	3	88,2	
		CA-7	Djoum	55		0,01	0,72	0,22	0,05	3	78,2	
		CA-8	Makalaya	18		0,01	0,80	0,16	0,03	3	88,9	
		CA-9	Yokadouma-Moloundou	12	0,01	0,02	0,41	0,10	0,47			
		CA-10	Mont-Koupé	6		0,02	0,78	0,16	0,03	3	80,0	
	Centrafrique	CE-1	Centrafrique	48		0,01	0,91	0,05	0,03	3	100,0	
	R. du Congo	CO-1	Ipendja	21		0,01	0,79	0,14	0,05	3	95,2	
		CO-2	Pokola	5		0,01	0,68	0,21	0,09	3	80,0	
	Gabon	GA-1	Libreville	19		0,01	0,08	0,88	0,03	4	100,0	
		GA-2	Ekarlong	11		0,01	0,21	0,74	0,04	4	90,9	
		GA-3	Lastourville	53		0,01	0,25	0,64	0,10	4	69,8	
		GA-4	Oyem	7	0,01	0,01	0,62	0,22	0,14	3	71,4	
		GA-5	Makokou	4		0,01	0,54	0,34	0,11	3	50,0	
		GA-6	Mandji	6	0,01		0,04	0,85	0,10	4	100,0	
		GA-7	Popa	4			0,24	0,69	0,07	4	100,0	
GA-8		Gabon isolé	3			0,26	0,65	0,08	4	66,7		
R.D. du Congo	RC-1	Luki	45			0,04	0,52	0,44	4	51,1		
	RC-2	Kinduala	49			0,05	0,55	0,39	4	55,1		
	RC-3	Yangambi	36	0,02	0,02	0,36	0,09	0,52	5	61,1		
	RC-4	RDC isolé	18			0,19	0,09	0,72	5	72,2		
Burundi	BU-1	Burundi	1			0,52	0,15	0,33	3	100,0		
Tanzanie	TA-1	Tanzanie	4			0,12	0,08	0,80	5	50,0		
	TA-2	Tanzanie isolé	2			0,03	0,06	0,91	5	100,0		

Le cluster 1 (*K1*) englobe les populations de la moitié ouest de l'Afrique occidentale (figure 2). Le Ghana, le Bénin et le Nigéria forment le cluster *K2*. En réalité, le Nigéria pourrait être la frontière entre les populations d'iroko d'Afrique de l'Ouest et celles d'Afrique Centrale (42,8% des irokos Nigériens sont assignés au cluster *K3*). Le cluster *K3* englobe les individus Camerounais, Centrafricains, Congolais, et du Nord-Est Gabonais. Le cluster *K4* comporte le reste des populations Gabonaises et celles du Sud de la R.D. du Congo, tandis que le cluster *K5* regroupe des irokos du Centre du continent, autour de la latitude moyenne de la RDC. Une population n'a pu être assignée à un cluster précis: Yokadouma-Moloundou (CA-9; Cameroun), qui est partagé entre les clusters 3 et 5 (43% du génome moyen provient de chacun de ces deux clusters). Au total, ce sont 33 individus (3,9% de l'échantillon) qui n'ont pu être assignés à aucun cluster. La figure S8 en annexe 1 schématise le partitionnement des génomes individuels au sein des clusters.

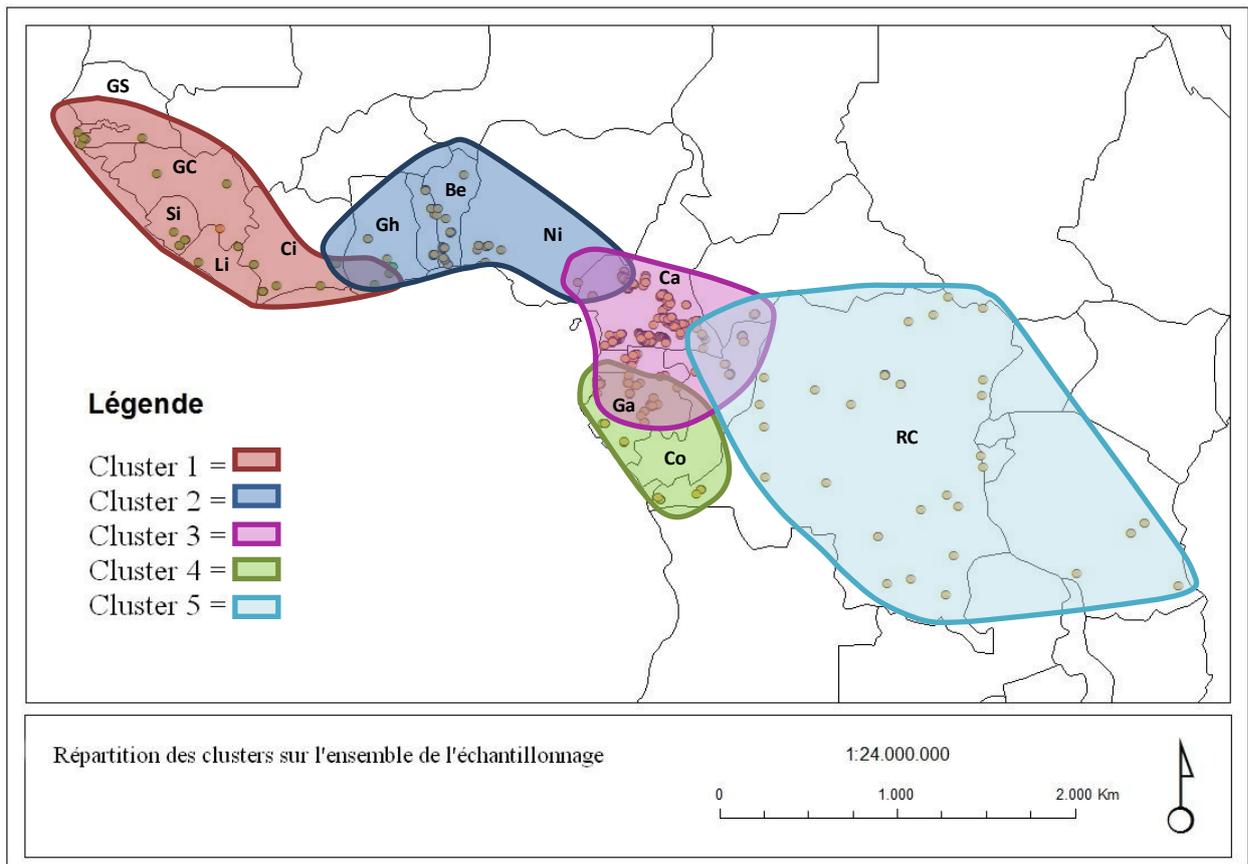


Figure 2. Carte de localisation géographique des 5 clusters d'iroko en Afrique sub-saharienne. Les points représentent les individus. Code des pays: GS = Gambie-Sénégal, GC = Guinée Conakry, Si = Sierra Leone, Li = Libéria, Ci = Côte d'Ivoire, Gh = Ghana, Be = Bénin, Ni = Nigéria, Ca = Cameroun, Ga = Gabon, Co = République du Congo, RC = RD du Congo.

Le tableau 4 donne les F_{ST} entre paires de pools géniques. Les groupes les moins différenciés sont les clusters *K3* et *K4*, avec un F_{ST} de 0,09. Les écarts génétiques les plus élevés s'observent entre le cluster 1 (dominé par *M. regia*) et les trois clusters d'Afrique Centrale. L'écart génétique entre ce cluster 1 et le cluster voisin 2 est du même ordre de grandeur que ce qui s'observe entre certains pools géniques constitués uniquement de *M. excelsa* (en Afrique Centrale). La comparaison des F_{ST} et R_{ST} ne trahit aucun signal phylogéographique lié à une

accumulation de mutation (modèle SMM), y compris entre l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique Centrale. A l'échelle de l'ensemble de l'échantillon, $R_{ST} = F_{ST} = 0,134$.

Tableau 4. Valeurs de R_{ST} (matrice inférieure) et F_{ST} (matrice supérieure) entre clusters résultant de l'analyse globale. * = F_{ST} significatif; ns = test $R_{ST} > F_{ST}$ non significatif.

	Cluster K1	Cluster K2	Cluster K3	Cluster K4	Cluster K5
Cluster K1		0,147 *	0,196 *	0,225 *	0,178 *
Cluster K2	0,192 ns		0,121 *	0,163 *	0,139 *
Cluster K3	0,301 ns	0,181 ns		0,087 *	0,110 *
Cluster K4	0,224 ns	0,113 ns	0,022 ns		0,158 *
Cluster K5	0,157 ns	0,189 ns	0,094 ns	0,041 ns	

4.3.4. Structure et diversité génétique des populations de l'Afrique de l'Ouest

En mode admixture, TESS détermine trois clusters dans la région allant du Sénégal au Nigéria. Le tableau 5 fournit l'assignation des populations à ces clusters. Un des clusters (K2) n'est majoritaire dans aucune population, mais l'observation détaillée des résultats montre qu'il est bien représenté dans 28 individus ($q > 0,50$) situés en Sierra Leone et au Ghana, ainsi qu'illustré sur la figure 3 (19% de l'effectif d'Afrique Occidentale).

Tableau 5. Assignation des populations d'Afrique de l'Ouest aux clusters et pourcentage d'individus concernés.

Pays	Code de la population	Nom de la population	N	Proportion du génome individuel moyen assigné à chaque cluster			Cluster principal	% d'individus assignés au cluster principal ($q > 0,50$)
				K1	K2	K3		
Gambie-Sénégal	GS-1	Gambie-Sénégal	6	0,99	0,05	0,04	1	100.0
Guinée Bissau	GB-1	Guinée Bissau isolé	1	0,98			1	100.0
Sierra Leone	SL-1	Sileti	39	0,57	0,42		1	59.0
	SL-3	Sierra Leone isolé	1	0,97	0,03	0,01	1	100.0
Guinée Conakry	GC-1	Guinée Conakry	11	0,64	0,14	0,22	1	63.6
Libéria	LI-1	Libéria isolé	1	0,85	0,12	0,03	1	100.0
Côte d'Ivoire	CI-1	Côte d'Ivoire	23	0,43	0,35	0,22		
Ghana	GH-1	Ghana	12	0,10	0,24	0,66	3	63.6
Bénin	BE-1	Bénin	40			0,99	3	100.0
Nigéria	NI-1	Nigéria	14			0,99	3	100.0

L'IBD explique sans doute partiellement la structuration observée en Afrique de l'Ouest: l'isolement par la distance a été détecté au sein des clusters, mais aussi entre clusters, indépendamment de l'identité taxonomique des individus (figure 4). Le détail des degrés d'admixture de chaque individu est présenté à la figure S9 de l'annexe 1.

Le tableau 6 présente les écarts génétiques ou niveaux de différenciation (F_{ST} et R_{ST}) inter-clusters ainsi que les indices de diversité des trois clusters de l'Afrique de l'Ouest. Les valeurs du R_{ST} ne sont jamais significativement supérieures à celles du F_{ST} , ce qui suggère que les mutations ont moins contribué à la structuration des populations étudiées que la dérive génétique et l'IBD. Il faut toutefois rappeler qu'une telle comparaison R_{ST} vs. F_{ST} n'est valable qu'en cas de modèle mutationnel "stepwise", ce qui n'est pas forcément garanti chez tous les

locus microsatellites. A l'échelle de la région, $F_{ST} = 0,194$ et $R_{ST} = 0,181$. La richesse allélique varie entre 4,7 et 5,3 et H_E est d'environ 0,6 dans chaque cluster. Le déficit d'hétérozygotes dans le cluster *K1* n'est qu'apparent, puisque les valeurs de F_{IS} corrigées démontrent des coefficients de consanguinité peu différents de 0.

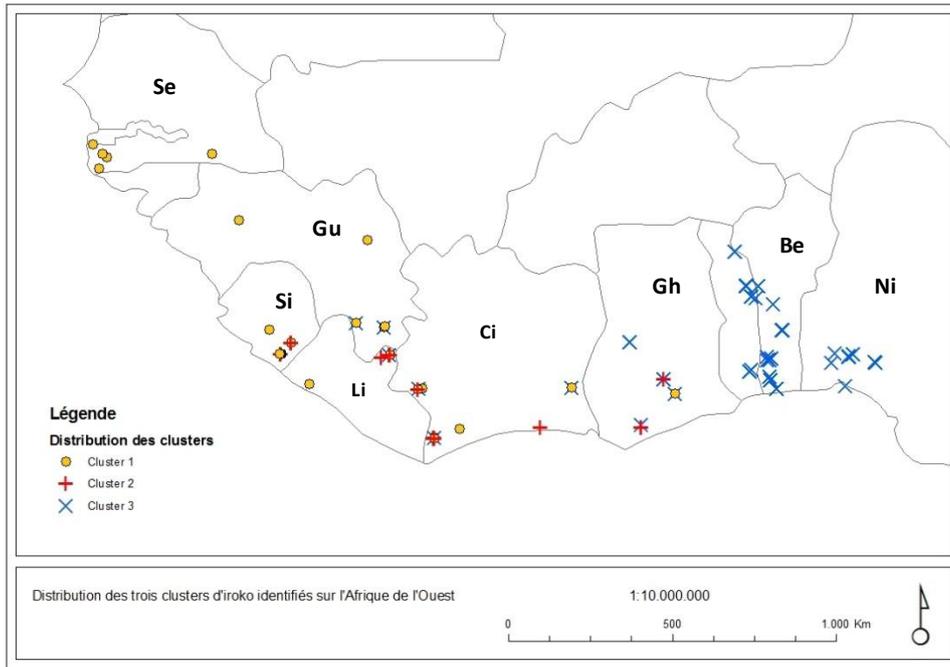


Figure 3. Localisation géographique des individus des 3 clusters d'Afrique de l'Ouest. Code des pays: Se = Sénégal, Gu = Guinée Conakry, Si = Sierra Leone, Li = Libéria, Ci = Côte d'Ivoire, Gh = Ghana, Be = Bénin, Ni = Nigéria.

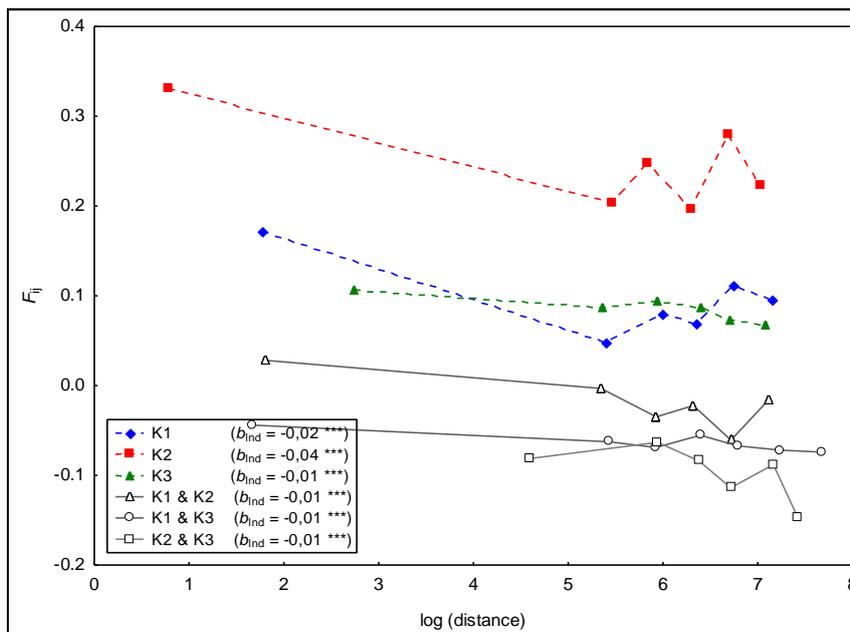


Figure 4. Evolution des coefficients de parenté F_{ij} en fonction du logarithme népérien de la distance entre individus. *K1* = cluster 1; *K2* = cluster 2, *K3* = cluster 3. "*K1* & *K2*" indique des F_{ij} entre paires d'individus appartenant à *K1* et *K2*, etc. b_{ind} = coefficient de régression. **** = très hautement significatif.

Tableau 6. Ecarts génétiques et indices de diversité des clusters de l'Afrique de l'Ouest. La richesse allélique R_S a été estimée pour des sous-échantillons de 27 individus. F_{IS_corr} = déficit d'hétérozygotes corrigé par INEst et son erreur standard (SE). Pour le R_{ST} : ns = test $R_{ST} > F_{ST}$ non significatif. Pour le F_{ST} et le F_{IS} : * = significatif, ** = hautement significatif.

	R_{ST} et F_{ST}			Indices de diversité et F_{IS}			
	Cluster K1	Cluster K2	Cluster K3	R_S (SE)	H_E (SE)	F_{IS}	F_{IS_corr} (SE)
Cluster K1		0,195 *	0,160 *	4,707 (0,224)	0,637 (0,013)	0,121 **	0,015 (0,015)
Cluster K2	0,049 ns		0,255 *	4,683 (0,279)	0,563 (0,032)	0,072 ns	0,009 (0,011)
Cluster K3	0,181 ns	0,287 ns		5,300 (0,263)	0,595 (0,02)	0,030 ns	0,012 (0,011)

4.3.5. Comparaison des assignations génétiques et identités morphologiques en Afrique de l'Ouest

Le tableau 7 donne la répartition des individus par cluster et par taxon selon le critère morphologique *Cav_pub*. Des 147 irokos de cette région, 19 n'avaient pu être associés à un taxon donné, par absence du matériel végétal indispensable (fragment de feuille). Des individus morphologiquement identifiés, on note que: (i) les 58 irokos assimilés à *M. excelsa* (présence de cavités pubescentes) se retrouvent entièrement dans un même cluster, K3. Tous les individus du Bénin et du Nigéria y sont inclus, ainsi que certains du Ghana, de la Côte d'Ivoire et de la Guinée-Conakry; (ii) les irokos identifiés comme *M. regia* (absence d'alvéoles pubescentes et présence de poils sur les nervures) se retrouvent en grande majorité dans les clusters K1 et K2: 65 individus sur 70, soit 93% des cas. Trois individus *M. regia* issus de la Côte d'Ivoire (GK0563, GK1035 et GK1110) ont toutefois un génotype associé à K3, lequel ne comporte autrement que le morphotype *M. excelsa*. Enfin, deux autres individus Ivoiriens assimilés à *M. regia*, GK0564 et GK0591, n'ont pu être assignés.

La figure 1 (paragraphe 4.3.1) montre une classification morphologique relative des clusters K1 et K2 suivant l'axe 2, lequel est déterminé en grande partie par la variable *l/L_limb*. En dehors de deux individus particuliers qui contrastent des autres spécimens de *M. regia* par une faible abondance de poils sur les nervures, tous les individus des clusters K1 et K2 sont caractérisés par l'absence de cavités pubescentes et une abondance élevée de poils sur les nervures secondaires. Par contre, des différences significatives s'observent entre individus de ces deux clusters pour les variables *l/L_lim* (*T* de Student; $t_{43} = -3,97$, $p < 0.001$) et *D_nerv* (*T* de Student; $t_{43} = 2,19$, $p = 0.034$), mais pas pour le paramètre *N_nerv* (*T* de Student; $t_{43} = 0,30$, $p < 0.772$). En moyenne, *l/L_lim* est plus faible en K1 (0,60) qu'en K2 (0,75).

Tableau 7. Répartition des irokos d'Afrique de l'Ouest dans les clusters et au sein des deux taxons.

Assignation génétique	Identité taxonomique			Total
	<i>M. excelsa</i>	<i>M. regia</i>	Inconnue	
Cluster K1		39	10	49
Cluster K2		26	2	28
Cluster K3	58	3	6	67
Non assignés		2	1	3
Total	58	70	19	147

4.3.6. Identification d'hybrides potentiels des deux espèces en Afrique de l'Ouest

Pour $K = 2$ clusters, le classement croissant des valeurs $(1 - q)$, que ce soit par STRUCTURE ou TESS met en évidence des individus avec des coefficients d'admixture q intermédiaires (compris entre 0.10 et 0.90; figure 5): neuf irokos selon TESS et dix selon STRUCTURE. Sept individus sont communs aux deux applications, dont GK0564, GK0591 et GK0677 qui sont trois des quatre spécimens de *M. regia* présentant $N_{nerv} \geq 13$. Par ailleurs, même pour un seuil d'assignation plus faible $q > 0,50$, les individus GK0564 et GK0591 n'avaient pu être assignés à aucun cluster (paragraphe 4.3.4). Les cinq autres individus avaient tous été assignés à *KI*. Tous ces sept arbres proviennent de la Côte d'Ivoire et de de la Guinée Conakry. Il est à noter enfin que de ces 12 irokos "douteux", un seul a été confirmé comme étant morphologiquement *M. excelsa*, les 11 autres appartenant à *M. regia*.

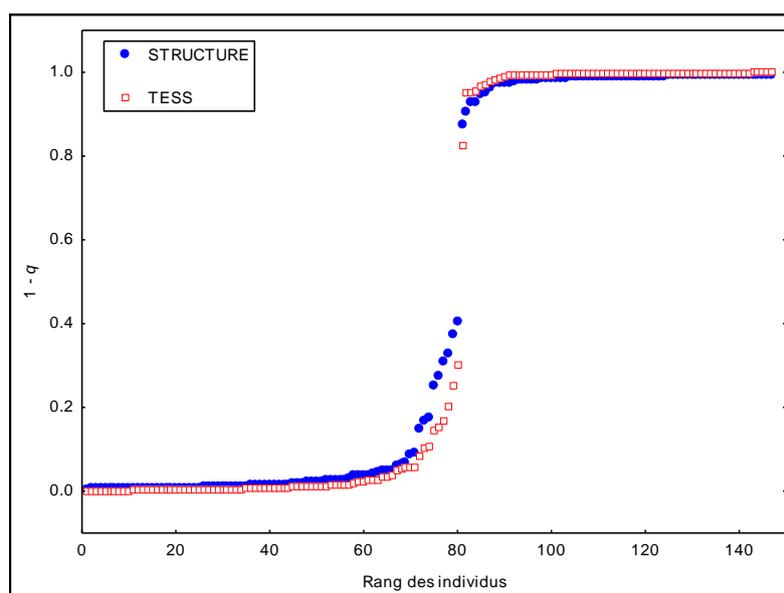


Figure 5. Classement des valeurs $(1-q)$ de la plus faible à la plus élevée, d'après les résultats de TESS et STRUCTURE.

4.3.7. Structure et diversité génétique des populations d'Afrique Centrale

En mode admixture, la détermination du nombre de pools géniques par TESS a produit quatre clusters. Le tableau 8 synthétise l'assignation des populations aux clusters. Le cluster *K1* est centré sur le Cameroun, la République Centrafricaine, le Nord du Gabon et de la R. du Congo, tandis que les clusters *K2*, *K3* et *K4* se situent dans l'ordre au Gabon, au Sud-Ouest de la R.D. du Congo et au Centre du continent (figure 6). Deux populations n'ont pu être assignées à aucun cluster selon le critère d'assignation retenu (au moins 50% du génome moyen correspondant à un cluster): Yokadouma-Moloundou (CA-9) qui se rapproche surtout de *K1*, et trois individus isolés au Gabon. Le détail du partitionnement des génomes individuels est donné à la figure S10 en annexe 1.

Il existe une sous-structure au sein des clusters: l'isolement par la distance est significative au sein de toute la région ($b_{\text{ind}} = -0,011$, $p < 0,0001$), mais aussi au sein de trois des quatre clusters, à l'exception du cluster 3 (zone côtière de la RDC). Par contre, les valeurs de b_{ind} ne sont presque jamais significatives entre clusters (tableau 9).

Tableau 8. Assignment des populations d'Afrique Centrale aux clusters et pourcentage d'individus concernés.

Pays	Code de la population	Nom de la population	N	Proportion du génome moyen individuel assigné à chaque cluster				Cluster principal	% d'individus assignés au cluster principal ($q > 0,50$)
				K1	K2	K3	K4		
Cameroun	CA-1	Gundi	15	0,89	0,10			1	100,0
	CA-2	Megan	10	0,94	0,06			1	100,0
	CA-3	Belabo	78	0,92	0,07			1	97,4
	CA-4	Belabo-Mindourou	10	0,89	0,10	0,01		1	100,0
	CA-5	Mindourou	113	0,89	0,08	0,02	0,01	1	98,2
	CA-6	Biyeyem	51	0,82	0,13	0,04	0,01	1	96,1
	CA-7	Djoum	55	0,79	0,17	0,02	0,01	1	83,6
	CA-8	Makalaya	18	0,84	0,11	0,02	0,02	1	88,9
	CA-9	Yokadouma-Moloundou	12	0,43	0,09	0,16	0,31		
	CA-10	Mont-Koupé	6	0,86	0,13	0,01		1	100,0
Centrafrique	CE-1	Centrafrique	48	0,92	0,03	0,01	0,03	1	100,0
R. du Congo	CO-1	Ipendja	21	0,81	0,11	0,03	0,05	1	90,5
	CO-2	Pokola	5	0,70	0,12	0,08	0,09	1	100,0
Gabon	GA-1	Libreville	19	0,14	0,80	0,06		2	100,0
	GA-2	Ekarlong	11	0,22	0,70	0,08		2	72,7
	GA-3	Lastourville	53	0,27	0,59	0,12	0,02	2	64,2
	GA-4	Oyem	7	0,75	0,17	0,07	0,01	1	100,0
	GA-5	Makokou	4	0,61	0,30	0,06	0,03	1	75,0
	GA-6	Mandji	6	0,04	0,77	0,19		2	83,3
	GA-7	Popa	4	0,27	0,50	0,22	0,01	2	25,0
	GA-8	Gabon isolé	3	0,33	0,41	0,26			
R.D. du Congo	RC-1	Luki	45	0,01	0,16	0,80	0,03	3	95,6
	RC-2	Kinduala	49	0,02	0,15	0,79	0,04	3	98,0
	RC-3	Yangambi	36	0,14	0,02	0,18	0,66	4	86,1
	RC-4	RDC isolé	18	0,09	0,01	0,21	0,67	4	88,9
Burundi	BU-1	Burundi	1			0,06	0,94	4	100,0
Tanzanie	TA-1	Tanzanie	4			0,14	0,86	4	100,0
	TA-2	Tanzanie isolé	2			0,21	0,79	4	100,0

Tableau 9. Valeurs des coefficients de régression b_{ind} de F_{ij} sur les distances logarithmiques $\ln(d_{ij})$, au sein et entre clusters d'Afrique Centrale; ns = non significatif, * = significatif, ** = hautement significatif, *** = très hautement significatif.

	b_{id} au sein des clusters	b_{ind} entre clusters			
		K1	K2	K3	K4
Cluster K1	-0,003 ***	/	0,002 ns	0,018 ns	-0,001 ns
Cluster K2	-0,010 ***		/	0,005 ns	-0,005 *
Cluster K3	-0,0006 ns			/	0,031 ns
Cluster K4	-0,006 **				/

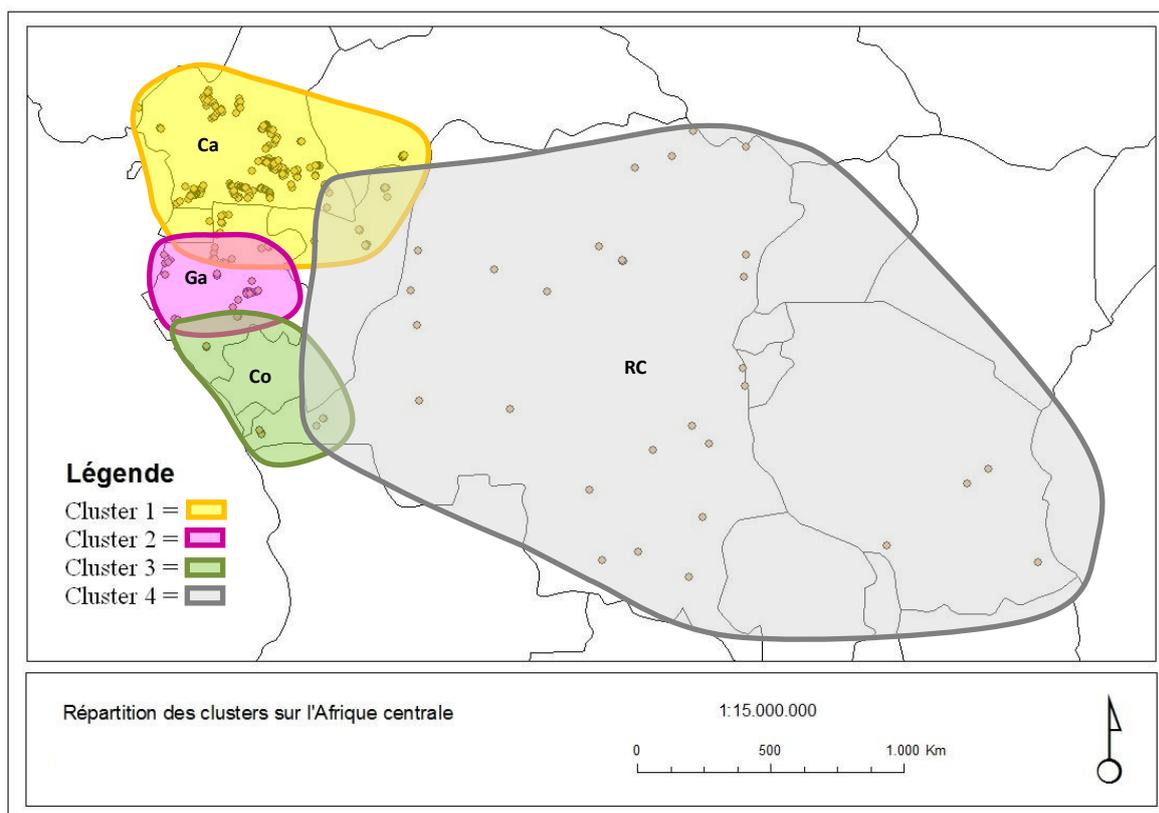


Figure 6. Carte de localisation géographique des 4 clusters en Afrique Centrale. Les points représentent les individus. Code des pays: Ca = Cameroun, Ga = Gabon, Co = République du Congo, RC = RD du Congo.

Les indices F_{ST} varient de 0,08 à 0,20, ce maximum étant obtenu entre le pool Gabonais ($K2$) et celui au cœur de la R.D. du Congo ($K4$) (tableau 10). D'une manière générale, $K2$ est le cluster qui présente le plus de différenciation avec tous les autres pools géniques, les trois autres clusters semblant plus proches les uns des autres avec des F_{ST} variant de 0,08 à 0,10. Le F_{ST} global dans cette région est de 0,11, identique au $R_{ST} = 0,11$. Aucune des valeurs du R_{ST} n'est significativement plus élevée que celles des F_{ST} (tableau 10), tendant à confirmer que la différenciation entre clusters est davantage liée à des phénomènes de dérive génétique et d'IBD qu'à des accumulations de mutations de type "pas-à-pas". Mais d'autres modèles mutationnels non pris en compte par la comparaison F_{ST} vs. R_{ST} pourraient également expliquer ces différenciations.

Tableau 10. Ecarts génétiques et indices de diversité des clusters d'Afrique Centrale. La richesse allélique R_S a été estimée pour des sous-échantillons de 21 individus. F_{IS_corr} = déficit d'hétérozygotes corrigé par INEst et son erreur standard (SE). Pour le R_{ST} : ns = test $R_{ST} > F_{ST}$ non significatif. Pour le F_{ST} et le F_{IS} : * = significatif, ** = hautement significatif.

	R_{ST} et F_{ST}				Indices de diversité et F_{IS}			
	$K1$	$K2$	$K3$	$K4$	R_S (SE)	H_E (SE)	F_{IS}	F_{IS_corr}
Cluster $K1$		0,123 *	0,081 *	0,098 *	3,509 (0,152)	0,448 (0,021)	0,022 ns	0,033 (0,021)
Cluster $K2$	0,284 ns		0,151 *	0,202 *	4,847 (0,237)	0,525 (0,015)	0,085 *	0,013 (0,014)
Cluster $K3$	0,134 ns	0,322 ns		0,104 *	4,156 (0,198)	0,455 (0,019)	0,109 **	0,012 (0,012)
Cluster $K4$	0,028 ns	0,193 ns	0,154 ns		5,081 (0,067)	0,492 (0,007)	0,127 **	0,022 (0,021)

En ce qui concerne les indices de diversité, on observe une richesse allélique moindre dans le cluster *K1* Camerounais (3,509), alors que R_S est comprise entre 4,156 et 5,081 dans les trois autres clusters. Les valeurs de l'hétérozygotie tournent autour de 0,5. Enfin, la présence d'allèles nuls semble biaiser une estimation fiable de l'indice F_{IS} .

4.4. Discussion

La présente étude est originale à plusieurs titres. Tout d'abord, de par son caractère novateur quant à l'étendue de la zone collectée et étudiée grâce à des collaborations entre différents centres de recherche. A notre connaissance, aucune autre étude phylogéographique n'a jamais été réalisée à une telle envergure en Afrique.

L'obtention de ces résultats dépendait avant tout de la possibilité d'extraire de l'ADN peu dégradé à partir de spécimens d'herbiers datant de plusieurs décennies. Il est actuellement impossible de recommander un protocole unique pour l'extraction d'ADN de vieux herbiers. De nombreux scientifiques semblent s'accorder sur l'efficacité des protocoles dérivés de la méthode CTAB (CetylTrimethyl Ammonium Bromide) (Weising et al. 2005; Edwards et al. 2008; Erkens et al. 2008), mais il n'est pas rare de trouver des cas où d'autres techniques ont été jugées tout aussi satisfaisantes (Jankowiak et al. 2005; Lambertini et al. 2008; Duminil et al. 2010), voire plus efficaces que la méthode CTAB (Drabkova et al. 2002). Selon Erkens et al. (2008), en définitive: (i) les protocoles dérivés du CTAB procurent généralement de meilleurs rendements d'ADN que les kits commerciaux, mais la pureté des solutions est meilleure avec ces derniers; (ii) l'efficacité des différents protocoles varie en fonction de l'espèce étudiée et plusieurs tests sont toujours indispensables pour définir la meilleure méthode; (iii) l'âge des herbiers n'est pas un indicateur fiable du succès de l'extraction et de l'amplification; enfin, (iv) l'amplification d'ADN d'herbier devrait toujours être comparée à celle de matériel frais afin de s'assurer que les locus de grande taille ont bien été amplifiés. Dans notre cas, les échantillons frais d'iroko d'Afrique de l'Ouest n'ont pas globalement révélé un profil différent de ceux des herbiers. Il n'est donc pas à craindre un biais lié à l'utilisation de matériel d'herbier pour les analyses effectuées.

Les résultats ont également permis l'identification et la cartographie de sept pools géniques chez l'iroko, sur la majeure partie de son aire de distribution. Plus précisément, on discerne trois clusters dont deux caractérisent les populations de *Milicia regia* et une, celle de *M. excelsa* en Afrique de l'Ouest, tandis que quatre pools délimitent les populations de *Milicia excelsa* dans le Guinée inférieure. Malgré l'absence de signal phylogéographique par la comparaison des R_{ST} et F_{ST} , les niveaux de différenciation obtenus au niveau de l'ADN nucléaire pour ces taxons ayant une distribution parapatrique suggèrent que cela résulterait d'une spéciation allopatrique.

4.4.1. Structuration de la diversité génétique de l'iroko confrontée à la théorie des refuges forestiers

On considère la fragmentation des populations comme l'un des phénomènes importants qui aurait déterminé la diversité et la structure génétiques de nombreuses espèces végétales. La fragmentation pourrait être la conséquence de perturbations climatiques majeures passées. Selon Maley (1996), la baisse de température et de pluviosité lors des périodes glaciaires se serait traduite par: (1) la descente de la végétation des montagnes vers des étages inférieurs, (2) la régression des forêts de plaines au profit des savanes. La végétation forestière n'aurait alors subsisté que dans des zones refuges isolées les unes des autres, entraînant la différenciation, voire la spéciation des populations présentes dans ces refuges. Maley (1996) identifie six principales zones refuges en

Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale lors des derniers maximums glaciaires du Pléistocène: une série de deux zones côtières au Libéria, un refuge en Côte d'Ivoire, une série de refuges côtiers Camerouno-Gabonais, une zone côtière au niveau du Bas-Congo, une autre zone refuge très vaste à l'intérieur du continent et qui s'étend sur les plaines congolaises, et une dernière zone située à l'Est de la RDC au niveau du Kivu.

Il est couramment admis que les refuges forestiers devraient correspondre aux zones où s'observent soit une importante richesse spécifique, soit un fort taux d'endémisme, les deux critères étant toutefois souvent corrélés (Plana 2004). Une analyse récente réalisée par Heuertz et al. (2010) de la diversité de 15 espèces de forêts denses humides d'Afrique Centrale ne révèle pas de concordance globale entre les régions où existent de forts endémismes alléliques et les refuges forestiers. Par ailleurs, de nombreuses études continuent de révéler l'existence de micro-refuges dont les effets sur la dynamique des populations végétales ne seraient pas moindres (Rietkerk et al. 1996). A l'échelle de l'espèce, les récents travaux de Duminil et al. (2010), Dauby et al. (2010) et Debout et al. (2010) mettent surtout en exergue une séparation génétique entre populations de part et d'autre de l'équateur. Bien que confirmant dans une certaine mesure la localisation grossière des refuges forestiers, la plupart de ces études n'ont pas réussi à identifier leur position exacte. En ce qui concerne les présents résultats sur l'iroko, on pourrait aisément trouver une certaine concordance entre les pools détectés et la localisation des refuges forestiers. Particulièrement en Afrique Centrale, les quatre pools identifiés pourraient résulter de l'extension des populations précédemment établies dans ces refuges: (i) les refuges camerounais pour le cluster camerounais, (ii) les refuges gabonais pour le cluster gabonais, (iii) le refuge du Bas-Congo pour le cluster du Bas-Congo, et enfin (iv) on pourrait supposer que le cluster situé à l'intérieur de la R.D. du Congo dérive grandement du refuge des plaines congolaises. Si les clusters très vastes (le cluster Camerounais et "intérieur-Congolais" notamment) jettent un certain flou sur la localisation probable des zones refuges, la subdivision de la zone côtière allant du Gabon jusqu'au Sud de la RDC en deux petits clusters coïncide remarquablement bien avec les séries de refuges proposées en ces lieux. Mais l'hypothèse de clusters issus des refuges forestiers est un peu moins évidente au niveau de l'Afrique de l'Ouest. Il est vrai que les deux séries de refuges identifiées dans cette région pourraient bien concorder avec les deux clusters à *M. regia*, mais l'origine du cluster Béninois demeure moins certaine.

Par ailleurs, si nous supposons qu'endémisme et richesse sont souvent corrélés (Linder 2001), nous pourrions nous attendre à des niveaux de richesse allélique plus élevés dans les populations proches des hypothétiques zones refuges. Or, en Afrique de l'Ouest, les populations proches des refuges proposés, SL-1 (Sierra Leone), CI-1 (Côte d'Ivoire) et GH-1 (Ghana) ne semblent pas présenter des niveaux de diversité bien plus importants que les autres populations de la même région (tableau 1). Le même constat peut être fait en Afrique Centrale où les populations voisines des zones refuges (RC-1 et RC-3 en RDC, ou encore CA-6 au Cameroun) ne paraissent pas plus diversifiées que les autres. L'endémisme allélique ne peut être comparé entre populations dans la présente étude du fait des forts taux de mutation des locus microsatellites et de leur tendance à l'homoplasie. Des marqueurs et séquences chloroplastiques polymorphes seraient mieux adaptés pour cet exercice en particulier.

Les résultats actuels ne permettent donc pas d'infirmer la localisation des refuges forestiers, mais ne la confirment pas totalement non plus. A ce titre, il est primordial de préciser que les refuges proposés sont ceux qui auraient été établis au cours du dernier maximum glaciaire, les études paléo-palynologiques ne permettant pas de retrouver les traces des zones refuges plus anciennes, comme celles qui auraient existé entre 160.000 et

130.000 ans BP (Maley 1996). Or, la durée et l'intensité de ces anciennes phases d'aridification climatique auraient parfaitement pu générer des zones refuges relativement distantes de celles proposées pour le dernier maximum glaciaire. Si l'on tient compte de cette précision, mais aussi du fait que les densités d'iroko en Afrique Centrale ne semblent pas avoir notablement souffert lors de la dernière glaciation (entre 20.000 et 15.000 ans BP; Elenga et al. 2004; Maley & Brenac 1998), on pourrait en déduire que les fragmentations majeures ayant engendré la structuration spatiale et génétique des populations d'iroko devraient être bien antérieures à la dernière glaciation. En étudiant *Distemonanthus benthamianus*, une autre espèce héliophile ayant une distribution continue dans le Bas-Guinéen, Debout et al. (2010) étaient parvenus à des conclusions similaires. Si la régression forestière en Afrique tropicale au cours de la dernière glaciation semble incontestable (une compilation presque exhaustive des études palynologiques ayant été faite par Anhuf et al. 2006 le prouve), le rôle des galeries forestières a pu être non négligeable et a pu limiter la rupture des flux de gènes entre populations de certaines espèces (Fjeldså & Lovett 1997).

Le rôle de l'homme dans la structuration de la diversité génétique des populations d'iroko ne devrait pas être non plus négligeable, du moins depuis quelques siècles ou millénaires. Tout comme cela a été noté chez d'autres espèces arborées héliophiles (White & Oates 1999; Duminil et al. 2010), l'agriculture itinérante sur brûlis accompagnant les mouvements des populations humaines au cours des siècles passés a certainement favorisé l'établissement de populations d'iroko au sein des massifs de forêts humides. Plus récemment, les perturbations anthropiques initiées au début des périodes de colonisation de l'Afrique par l'Europe ne sont certainement pas à sous-estimer. Les premières traces écrites de commercialisation de l'iroko en Europe datent du début du XIX^e siècle (Mauriès 1970). A une époque un peu plus récente, Sueur et al. (2008) signalent aussi que l'iroko était particulièrement recherché par les colons Allemands établis en Tanzanie. Bien qu'il soit évident que plusieurs générations soient nécessaires avant qu'un *bottleneck* puisse être observable, sa détection peut être possible après seulement quelques générations en cas de sévère réduction de la taille de population: par exemple, quatre générations suffiraient, mais en utilisant 50 locus (Luikart et al. 1998). Spencer et al. (2000) ont noté des signes de *bottleneck* à l'aide de huit marqueurs microsatellites (en moyenne, 18,8 allèles par marqueur), après seulement deux à trois générations dans des populations soumises parfois à de faibles intensités de *bottleneck*. D'une manière générale, moins les locus sont polymorphes, plus grand sera le nombre de locus marqueurs à utiliser pour détecter un événement récent de goulot d'étranglement. Les marqueurs utilisés dans la présente étude ne sont certainement pas des plus polymorphes (5 à 13 allèles par locus marqueur), mais il n'est pas impossible que l'intensité de l'exploitation à laquelle ont été confrontées certaines populations d'iroko par le passé (Nichols et al. 1998; Ofori 2007a,b) ait permis leur détection dans le cas actuel, mais uniquement suivant le modèle mutationnel IAM. Le modèle mutationnel SMM donne des résultats plutôt contraires, qui semblent indiquer une rapide érosion génétique en Afrique Centrale, et plus particulièrement au Cameroun. En réalité, il est possible qu'aucun de ces types de mutation ne soit le plus vraisemblable dans le cas actuel: aucune conclusion satisfaisante ne devrait donc être émise quant à la dynamique récente des populations d'iroko.

En ce qui concerne le niveau de diversité entre régions, les analyses, aussi bien à l'échelle des populations (tableau 2) qu'à l'échelle des clusters (tableaux 6 et 10), tendent à montrer une certaine diminution de la diversité de l'Afrique de l'Ouest vers le Bas-Guinéen et le domaine Congolais. Rappelons toutefois que les marqueurs utilisés ont été développés pour des populations d'Afrique de l'Ouest situées dans les clusters *K1* surtout, et *K2* dans une moindre mesure (Ouinavi et al. 2006). Cela expliquerait les traces d'*inbreeding* par l'indice F_{IS} ,

particulièrement dans tous les autres pools géniques. Les valeurs de F_{IS} corrigées par INEst tendent d'ailleurs à montrer qu'elles ne différeraient pas significativement de zéro. La relative faiblesse de la diversité génétique en Afrique Centrale devrait donc être réestimée par d'autres marqueurs.

4.4.2. Hybridation et structuration de la diversité génétique en Afrique de l'Ouest

Plusieurs éléments des résultats tendent à suggérer l'existence d'hybridation entre les deux espèces: (i) l'existence d'IBD inter-clusters, montrant que les paires d'individus interspécifiques sont d'autant plus proches génétiquement qu'ils sont séparés par de faibles distances (figure 4); (ii) le fait que certains individus affichent des génomes "admixés" (figure S9 en annexe 1); (iii) la différenciation génétique inter-clusters en Afrique de l'Ouest n'est pas plus importante que ce qui s'observe entre certaines populations de *M. excelsa* en Afrique Centrale; (iv) le fait que deux programmes différents identifient en commun sept individus comme n'étant pas suffisamment "purs" et que trois de ceux-ci présentent des nombres de nervures supérieurs à ce qui est attendu de leur identité taxonomique (basée sur la présence ou non de cavités pubescentes et de poils sur les nervures). Par ailleurs, les résultats partiels des travaux de M. Heuertz (comm. pers.; analyses non achevées) ont mis en exergue des séquences partagées entre les morphotypes *M. regia* et *M. excelsa* d'Afrique de l'Ouest, ces séquences sont absentes des irokos d'Afrique Centrale (régions *psbA-tmH* et *tmC-ycf6*). L'hybridation paraît donc réalisable entre *M. excelsa* et *M. regia*. Toutefois, les résultats actuels tendent à démontrer qu'elle serait peu fréquente, au vu de la proportion d'individus concernés. De plus, dans la mesure où tous ces individus s'apparentent davantage à *M. regia* (à l'exception d'un seul, selon STRUCTURE), on serait amené à estimer que l'hybridation se déroule surtout dans un seul sens. Néanmoins, ces conclusions peuvent avoir été biaisées par la distribution de l'échantillon étudié (concentrée dans la zone forestière côtière de la région probable d'hybridation). En effet, *M. regia* étant théoriquement plus abondante que *M. excelsa* en zones de forêt dense humide, on peut supposer que les collectes avaient plus de chances d'échantillonner des hybrides "backcross" vers *M. regia*. Il est possible qu'un échantillonnage dans des formations plus ouvertes du Centre du Ghana et de la Côte d'Ivoire (zones de forêts semi-décidues, moins fermées) révèle également des formes hybrides proches de *M. excelsa*.

Il est également ressorti des analyses qu'il pourrait exister en réalité deux morphotypes de *M. regia*, différant essentiellement par la largeur relative du limbe et correspondant à deux clusters également distincts (bien qu'en analyse globale, ces deux clusters soient confondus). Plus surprenant est l'important écart génétique entre ces deux clusters *K1* et *K2* ($F_{ST} = 0,195$). A notre connaissance, aucune barrière physique importante n'aurait pu entraver l'expansion des populations de *M. regia* dans cette région, et un isolement géographique, même récent (dû par exemple à la dernière période glaciaire) ne semble pas non plus crédible: l'iroko affiche des distances de dispersion génique importantes grâce à la pollinisation par le vent et la dissémination des diaspores par des chauves-souris et des oiseaux (chapitre 7). De plus, les forêts denses de la région ayant été sérieusement fragmentées par le passé, l'expansion de l'iroko aurait dû être favorisée par l'ouverture du couvert végétal. Enfin, l'analyse des fiches d'herbiers ne semble pas indiquer de déphasage phénologique entre populations d'Afrique de l'Ouest. Tout comme la différenciation génétique marquée entre l'Afrique de l'Ouest et l'Afrique Centrale, au niveau de l'ADN nucléaire, s'explique difficilement, nous ne disposons guère de faits écologiques convaincants qui puissent servir à l'interprétation de ces résultats.

Trois éléments des résultats tendent à faire supposer que le morphotype particulier de *M. regia* apparu dans le cluster *K1* (celui situé le plus à l'ouest) pourrait être constitué en réalité d'hybrides relativement proches de *M.*

excelsa: (i) cinq des sept hybrides détectés par TESS et STRUCTURE sont assignés à *K1* (les deux autres n'ont été assignés à aucun cluster); (ii) l'indice F_{ST} entre *K1* et *K3* est de 0,16 tandis qu'il est de 0,26 entre *K3* et *K2* (centré sur le sud de la Côte d'Ivoire et du Ghana); enfin, (iii) certes, les irokos de *K1* ne diffèrent pas de ceux de *K2* par le nombre moyen de nervures, mais se rapprochent davantage de ceux de *K1* par les dimensions relatives de leurs feuilles. Une telle hypothèse expliquerait aussi la présence de ce que nous considérons comme *M. regia* dans des régions assez peu humides (Gambie, Sénégal, etc). A ce stade des interprétations, l'analyse du génome chloroplastique serait réellement opportune pour une meilleure compréhension du phénomène.

Autre fait difficilement explicable: l'absence de *M. regia* de l'Afrique Centrale. Si cette espèce préfère effectivement les forêts denses humides et a pu s'établir facilement en Afrique de l'Ouest, il est alors surprenant qu'elle n'ait pu être présente dans le Bas-Guinéen avant l'apparition du Dahomey Gap. Ce couloir sec au sein du bloc forestier Guinéo-Congolais était couvert de forêt dense humide durant les périodes interglaciaires des 150.000 dernières années (Dupont & Weinel 1996). Plus précisément encore, il a été noté en Afrique Centrale que la forêt dense humide était présente dans cette région entre 9.000 et 4.500 ans BP. Une première phase aride est survenue entre 4.500 et 3.300 ans BP, suivie d'une ré-extension des forêts jusqu'à 1.100 ans BP: ce n'est qu'à partir de cette date qu'un climat sec s'est durablement installé dans cette zone comprenant le Togo et le Bénin (Salzmann & Hoelzmann 2005). Autrement dit, les perturbations climatiques qui auraient pu entraver l'extension de *M. regia* sont beaucoup trop récentes pour expliquer son absence de l'autre côté du Dahomey Gap. Une autre hypothèse pourrait expliquer la localisation restreinte de *M. regia*: cette espèce résulte d'une spéciation relativement récente de *M. excelsa*. L'apparition rapide de barrières reproductives au sein de populations en sympatrie est loin d'être un phénomène rare, y compris chez les plantes (Hendry et al. 2007). Soumise par exemple à différents traitements d'engrais, une population initialement homogène de *Anthoxanthum odoratum* (graminée vivace allogame) a affiché des divergences phénotypiques marquées au bout d'un siècle (Snaydon & Davies 1976). Récemment, Silvertown et al. (2005) ont démontré l'existence d'une barrière reproductrice (existence d'une structure génétique) entre groupes précédemment soumis aux différences de traitements d'engrais, et ce, sans isolement par la distance. Le phénomène est bien mieux documenté chez les animaux, où des adaptations divergentes et spéciations d'hybrides peuvent apparaître en l'espace de quelques dizaines de générations (e.g., Hendry et al. 2000; Bearhop et al. 2005; Nolte et al. 2005). Si confirmée, une telle spéciation dans le cas l'iroko serait donc liée à un gradient écologique (évolution parapatrique). Mais, il nous est actuellement impossible de prouver l'existence d'un environnement particulier qui expliquerait une telle spéciation.

A priori, l'hybridation semble de faible ampleur, à moins que l'interprétation des résultats ait été biaisée par l'échantillonnage, lequel, entre la Sierra Leone et le Ghana, a été conduit dans la région forestière côtière, où dominerait *M. regia* par rapport à *M. excelsa* (Nichols et al. 1998). Pour approfondir la question, l'analyse de l'ADN chloroplastique devra être complétée. Mais aussi, une étude plus détaillée de la biologie florale des deux espèces devrait être entreprise, surtout celle de *M. regia*. Par ailleurs, un effort d'échantillonnage plus important serait souhaitable dans la zone d'hybridation (Côte d'Ivoire, Ghana). En effet, en cas de taux d'hybridation faible, la détection des formes hybrides ne serait aisée qu'avec un nombre conséquent d'individus (Craft et al. 2002; Barilani et al. 2007). On retiendra enfin que 3 spécimens sur 4 de *M. regia* à nombre de nervures ≥ 13 s'avèrent être des hybrides d'après les résultats ressortant aussi bien de TESS que de STRUCTURE: cela mérite d'être approfondi mais ce critère pourrait s'avérer intéressant pour identifier des hybrides.

Dans tous les cas, la présente étude a pu prouver que quelques rares traits foliaires pouvaient servir à l'identification des deux taxons (dans 95% des cas au moins), bien qu'aucun ne s'avère totalement fiable, si nous admettons que les erreurs ne proviennent pas du génotypage. La distinction entre plantules paraît aisée: l'abondance des poils chez *M. excelsa* est nettement supérieure à celle observée chez *M. regia*. Sur le terrain et pour des arbres adultes, on aura tendance à privilégier des caractères facilement observables tels que le nombre de nervures secondaires combiné à la largeur relative du limbe, mais le meilleur critère de différenciation ne peut s'observer qu'à l'aide de loupes puissantes et dans des conditions de luminosité élevée: la présence ou non d'une fine pubescence contenue dans de minuscules alvéoles entre les nervilles. Quant à la différence entre les fleurs femelles des deux taxons (présence de poils à la base du sépale chez *M. excelsa*), elle est quasiment inutilisable dans les conditions d'observations courantes: la période de floraison est trop courte chez l'iroko et les inflorescences sont trop éphémères, de sorte qu'il est assez difficile d'en obtenir (Nyong'o et al. 1994; chapitre 7).

4.5. Conclusion

Une organisation spatiale de la diversité génétique des populations d'iroko a été mise en évidence. Pour *Milicia excelsa* qui affiche une large distribution géographique continue et des caractéristiques typiques des espèces pionnières, de telles divergences génétiques ne peuvent résulter que de fragmentations anciennes et prolongées. L'accumulation de mutations divergentes devrait alors être un signal d'une telle fragmentation, mais n'a pu être prouvée dans le présent cas, du moins, s'agissant des mutations "par pas" des microsatellites. Quoi qu'il en soit, le positionnement des clusters semble partiellement conforter l'hypothèse des refuges forestiers. Par ailleurs, bien que cela n'ait pu être montré sur le plan morphologique par la présente étude, des formes hybrides des deux espèces semblent réellement exister au vu des résultats fournis par les marqueurs nucléaires neutres utilisés. De plus, deux morphotypes distincts de *M. regia* paraissent être présents dans le milieu. Si l'étude de l'ADNcp était approfondie, elle devrait permettre de mieux comprendre aussi bien l'importance et le sens des flux de gènes entre ces taxons que le rôle du paléoclimat sur les structures génétiques des populations. Le présent travail a également confirmé, sur une base morphologique, l'absence de *M. regia* de l'Afrique Centrale, fait qui demeure inexplicable sans des analyses morphologiques et génétiques complémentaires.

Remerciements

Cette étude a bénéficié du soutien financier de Gembloux Agro-Bio Tech, de l'Agence Universitaire de la Francophonie et du projet Makala (RDC). Nous remercions particulièrement le Jardin Botanique National de Belgique (Meise) qui a autorisé le prélèvement d'échantillons de feuilles, et aussi MM. David Monticelli, Guillaume Koffi, Lambert Y. Kouadio, Michel Baudoin, Shango Mutambue, Jean-Pierre Mate, Emilien Dubiez, Pierre Procès, Bertin Kasongo, Pat Stoffelen, Didier Leurquin et Georges Mumbere pour leur diverses contributions.

5. Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae) (Article 3)

Kasso Daïnou, Jean-Philippe Bizoux, Jean-Louis Doucet, Grégory Mahy, Olivier J. Hardy, Myriam Heuertz

Molecular Ecology **19**, 4462-4477

Abstract. The impact of the Pleistocene climate oscillations on the structure of biodiversity in tropical regions remains poorly understood. In this study, the forest refuge theory is examined at the molecular level in *Milicia excelsa*, a dioecious tree with a continuous range throughout tropical Africa. Eight nuclear microsatellites (nSSRs) and two sequences and one microsatellite from chloroplast DNA (cpDNA) showed a deep divide between samples from Benin and those from Lower Guinea. This suggests both that these populations were isolated in separate geographical regions, probably for several glacial cycles of the Pleistocene, and a poor mixture of gene pools despite *M. excelsa*'s wind-pollination syndrome. The divide can also be related to seed dispersal patterns, which should be largely determined by the migration behaviour of *M. excelsa*'s main seed disperser, the frugivorous bat *Eidolon helvum*. Within Lower Guinea, a north-south divide, observed with both markers despite weak genetic structure (nSSRs: $F_{ST}=0.035$, cpDNA: $G_{ST}=0.506$), suggested the existence of separate Pleistocene refugia in Cameroon and the Gabon/Congo region. We inferred a pollen-to-seed dispersal distance ratio of 1.76, consistent with wide-ranging gene dispersal by both wind and bats. Simulations in an Approximate Bayesian Computation framework suggested low nSSR and cpDNA mutation rates but imprecise estimates of other demographic parameters, probably due to a substantial gene flow between the Lower Guinean gene pools. The decline of genetic diversity detected in some Gabonese populations could be a consequence of the relatively recent establishment of a closed canopy forest which may negatively affect *M. excelsa*'s reproductive system.

Keywords: forest refugia, spatial genetic structure, Approximate Bayesian Computation, *Milicia excelsa*, cpDNA, nuDNA, tropical Africa.

5.1. Introduction

The factors governing speciation and the geographical distribution of taxons in tropical ecosystems are of long-standing interest to ecologists, biogeographers and evolutionary biologists. Current research in these disciplines focuses on the relative importance of selectively neutral processes such as dispersal or divergence due to drift and that of selection to explain the organization of tropical biodiversity at different levels (e.g., Hubbell 2001; Leigh 2007). In this context, it is also important to gain further insight into the impact of vegetation history on the current distribution and composition of tropical ecosystems (Moritz et al. 2000).

The forest refuge theory has been formulated to explain species distribution patterns, essentially vicariant distributions and/or high levels of floral or faunal endemism, advocating that fragments of tropical forest would have acted as shelters for rainforest taxa and have allowed their survival and evolution through the Pleistocene cold stages (Aubréville 1962; Prance 1982; Sosef 1996). The isolation in forest refuges is thought to have led to a divergence of taxa essentially because of genetic drift, probably in combination with natural selection, ultimately leading to speciation. Critics of the theory have observed that substantial phenotypic divergence occurs under differential selection pressures in tropical taxa without the need for isolation and in the presence of gene flow, which supports a divergence with gene flow model of speciation (e.g., Rice & Hostert 1993; Smith et al. 2001). Also, vicariant distribution patterns could alternatively be due to geomorphological barriers related to the floodplain dynamics (Salo 1987).

Relatively recent stratigraphic and palaeoecological data indicated that late Pleistocene vegetation history differed markedly between continents. In Africa, the Pleistocene cold stages were characterized by cool and dry climates which led to the fragmentation of lowland rainforests and their wide replacement by tropical seasonal forests or savannahs in the driest areas (Maley 1996; Bonnefille 2007) whereas in the Amazon Basin, Pleistocene conditions seem not to have led to a marked forest fragmentation (Colinvaux et al. 2001; Kastner & Goñi 2003). Unlike in temperate regions, where an extensive palaeoecological record and studies of maternally inherited chloroplast DNA (cpDNA) markers have identified the refuge locations and colonization histories of many taxa (Tarasov et al. 2000; Petit et al. 2003), locating refuges and colonization routes for particular taxa in tropical regions is much more challenging, not least because palaeoecological data are still scarce. In Atlantic Equatorial Africa, for instance, modern pollen rain studies have recently shown that percentages of arboreal pollen effectively reflect tree coverage in wet-evergreen and semi-evergreen forests and that different forest types have clearly distinct pollen assemblages (reviewed by Bonnefille 2007). However, the geographical coverage of these studies needs to be extended (A.M. Lézine, pers. com.). Recent reviews list only about 16 postglacial fossil pollen cores for tropical West Africa and the Congo Basin, most of which are incomplete, discontinuous and/or insufficiently dated (Bonnefille 2007, Lézine 2007). An exception is an extraordinarily complete profile from lake Barombi Mbo (close to Mount Cameroon), demonstrating persistent forest cover of variable extent during the last glacial period (c. 32-11.5 kcal yr BP, Maley & Brenac 1998). Also at the Ngamakala lake (between the Bateke plateaux and the Congo River in the Republic of Congo), forest persisted during the glacial period (Elenga et al. 2004). In the Guineo-Congolian region, comprising the phytogeographical domains of Upper Guinea (West Africa), Lower Guinea (centred on South Cameroon and Gabon) and Congolia (Congo river basin, White 1979; Küper et al. 2004), a joint interpretation of plant and animal species distributions and

palaeoecological data led to the suggestion of rainforest refugia in the three domains. Lower Guinea, in particular, harbours six proposed refugia (Maley 1996): two in South-west Cameroon, three in Gabon, and one in the Mayombe region north of the mouth of the Congo River. Studies on species richness and endemism in large plant families like Begoniaceae, Orchidaceae and Rubiaceae supported approximately the geographical locations of some of these refugia (Sosef 1996; Droissart 2009). In contrast, Caesalpinoideae species distributions support glacial persistence outside of proposed refugia (Leal 2004) and the emerging palaeoecological data indicate that species compositions of past plant communities sometimes markedly diverge from today's (Bonnefille 2007, Lézine 2007). Therefore, which tropical forest taxa indeed survived adverse conditions in refugia, where refugia were located and what is their impact on the structure of biodiversity are much debated questions which have wide implications for biogeography, evolutionary biology and conservation.

Phylogenetic and population genetic studies are anticipated to provide valuable data to test the forest refuge theory and to infer refuge locations in Africa (Plana 2004). This might be particularly true for tree species: due to their longevity, great size and high reproductive output, trees have generally low speciation rates (Petit & Hampe 2006) so that the effects of Pleistocene isolation are expected at the within-species level. In temperate regions, comparisons of genetic with palaeoecological data in different species generally revealed distinct genetic lineages and/or endemic haplotypes in distinct refuge populations (Petit et al. 2003; Heuertz et al. 2006). In addition, the level of genetic structure, and therefore the potential to reflect historical population isolation, is determined partly by life history traits in temperate tree species: species with large geographic ranges and wide-ranging seed dispersal displayed low differentiation at maternally inherited cpDNA markers and long-lived outcrossing species displayed low structure at biparental markers (Duminil et al. 2007). If similar processes shape genetic patterns in the tropics, endemic haplotypes and vicariant lineages could be interpreted as a legacy of forest refuges. Large-scale genetic surveys remain rare in tropical forest trees, although they are beginning to reveal signals of vicariance and/or colonization routes for some species in America (e.g., Cavers et al. 2003; Dick & Heuertz 2008) and Africa (e.g., Muloko-NToutoume et al. 2000; Dauby et al. 2010; Lowe et al. 2010; Duminil et al. unpublished results). In Africa, studies have so far concerned species with fairly limited dispersal capacities and have mostly focused on Lower Guinea. The two proposed Cameroonian refugia were supported with nuclear and cpDNA markers in *Irvingia gabonensis*, a species considered to have a low genetic propensity to dispersal (Lowe et al. 2010). In *Aucoumea klaineana*, a wind-dispersed pioneer near-endemic of Gabon, genetic structure at nuclear microsatellites was compatible with a Holocene expansion from the three proposed Gabonese refugia (Born 2007). Other species such as the mostly gravity-dispersed *Erythrophleum suaveolens*, the wind-dispersed *Distemonanthus benthamianus*, and the bird and monkey dispersed *Greenwayodendron suaveolens*, displayed similar north-south divides in their genetic structures paralleling the seasonal inversion near the equator, despite the fact that the two first are light-demanding species while the third regenerates readily under the canopy (Duminil et al. 2010; Debout et al. 2010; Dauby et al. 2010). It thus appears that our knowledge of the impact of the Pleistocene climate changes on the genetic structure of African rainforest trees and their covariance with species life history traits is still very fragmentary. Moreover, only a few studies have so far considered samples beyond the Lower Guinea domain and have assessed genetic structure at both nuclear and chloroplast DNA markers.

We here wish to gain further insight into the role of Pleistocene forest fragmentation on the structure of African rainforest trees by investigating the distribution of genetic diversity and population genetic processes in a tree

species that presents uncommon life history traits in several respects. *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg (*Moraceae*) is an African timber tree species commonly named “iroko” with a wide and continuous geographical range, occurring from Ivory Coast to Mozambique and Tanzania. It colonizes contrasted habitats (rainforests to woodlands) and requires light to regenerate (Jøker 2002), i.e. it regenerates in forest gaps in rainforests. *M. excelsa* is dioecious and wind-pollinated (Jøker 2002), and features long-distance seed dispersal through bats and parrots (*cf.* chapter 7). The combination of wind-pollination with seed dispersal by vertebrates at large distances is a rare dispersal strategy in tropical rainforest trees and should a priori lead to very long-distance gene dispersal and therefore very weak genetic structure. We have previously shown that genes indeed disperse over long distances in forest zones ($\sigma_g = 1-7.1$ km), resulting in a weak genetic structure at nuclear microsatellites through Cameroonian forests (Bizoux et al. 2009). However, the relative contributions of seed and pollen to gene dispersal remain unknown. Moreover, historical events could have led to a persistent differentiation between some *M. excelsa* populations from distinct phytogeographical domains, or even within a domain. If distinct gene pools can be detected despite the strong colonization capacity of the species, they might be the result of major fragmentation of forest habitats in the past. As a threatened species in most African regions (Ofori & Cobbinah 2007), knowledge on the genetic structure of *M. excelsa* is also useful for conservation purposes.

We analyzed population samples of *M. excelsa* from Upper Guinea (Benin) and Lower Guinea (Cameroon, Central African Republic, Republic of the Congo and Gabon) with nuclear and chloroplast markers and applied recent methods for the inference of genetic structure and demographic parameters to address the following questions:

1. Given the high dispersal capacities, is there evidence for differentiated gene pools? In particular, is there genetic evidence of a long-term separation between Upper and Lower Guinean populations and/or evidence of distinct gene pools in Lower Guinea related to distinct forest refugia?
2. Which relative estimates of seed and pollen dispersal are obtained from the genetic structure at chloroplast and nuclear markers?
3. Which historical population demographic scenarios could explain the current patterns of genetic structure and diversity?
4. Given that the species is considered “near-threatened” according to IUCN, are there any populations that are genetically depauperated and, therefore, more vulnerable to on-going harvesting, fragmentation and habitat loss?

5.2. Materials and Methods

5.2.1. Study species

Milicia excelsa (Welw.) C.C. Berg (*Moraceae*) is a light-demanding tree, found in a wide range of habitats. As its population density increases from the Wet Evergreen Forest Zone to the Dry Semi-deciduous Forest Zone (Nichols et al. 1998), the ecological factors which influence its abundance, natural regeneration and gene flow could be specific to each type of vegetation. Genetic studies of two closely related *Milicia* species in Ghana, *M. excelsa* and *M. regia*, identified low genetic diversity at the genus level using random amplified polymorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) and chloroplast DNA sequencing (Ofori et al. 2001; Ofori

& Cobbinah 2007). In Cameroon, where *M. excelsa* occurs at low population densities (2 to 25 trees/km²; Fétéké et al. 2004), Bizoux et al. (2009) also found low diversity and very low levels of spatial genetic structure, which they attributed to extensive wind-mediated pollen dispersal and efficient seed dispersal by frugivorous bats and parrots. The most common animals found to harvest fruits of iroko trees in Cameroon are a fruit bat, *Eidolon helvum*, and two parrots, *Psittacus erithacus* and *Agapornis swindernianus* (cf. chapter 7).

M. excelsa has several economic and social interests for African countries. In the case of Ghana, its ecological characteristics and forest management have been studied for many years (e.g., Nyong'o et al. 1994; Mancini et al. 2001; Ofori & Cobbinah 2007). The species is suffering important reductions of population density due to a high rate of exploitation and a poor natural regeneration (Ofori & Cobbinah 2007). Exportation of iroko logs is now forbidden in Ivory Coast, Ghana and Cameroon, but the export of sawnwood is allowed (Ofori 2007).

5.2.2. Plant material and DNA extraction

Leaves or cambium samples of 550 *M. excelsa* individuals were collected in Benin in West Africa (Upper Guinea) and from four countries of Central Africa (Lower Guinea): Cameroon, Central African Republic (CAR), Gabon and Republic of the Congo (RC). Since *M. excelsa* has a continuous natural range and sampling was also relatively continuous, individuals were arbitrarily grouped into 21 geographically coherent populations (Table 1, Figure 1, Table S1, Supporting Information). Populations were named using the two first letters of the country where they were sampled plus a number. Although we tried to define populations extending over less than 100 km and separated by more than 100 km, population CA-2 was less than 100 km away from CA-1 and CA-8 and the maximal distance between individuals exceeded 100 km in BE-2 and CA-4. The sampled areas included forests, fallows, food and cash crop fields and human habitats. Samples were silica-dried and DNA of all individuals was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands).

5.2.3. Genetic marker analysis

Eight nuclear microsatellite (nSSRs: Mex51, Mex63, Mex69, Mex81, Mex95, Mex137, Mex163a and Mex202; Ouinsavi et al. 2006) were genotyped as described in Bizoux et al. (2009). Briefly, the forward primer of each locus was labelled with a fluorescent dye and amplifications were performed in two PCR-multiplexes. PCR fragments were resolved on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and sized in comparison with the GS400HD size standard (Applied Biosystems) using the software GeneMapper 3.0 (Applied Biosystems). All retained multilocus genotypes were scored for at least 6 loci. Genotyping was repeated for around 10% of all individuals (from 7.8 to 11.8% according to the locus) to detect PCR errors and allelic dropout. Missing data per locus ranged from 0.7% (Mex51) to 4.5% (Mex95).

cpDNA was first screened for polymorphism (Data S1, Supporting Information) at eight chloroplast DNA microsatellites (cpSSRs, Weising & Gardner 1999) and in six cpDNA sequences suggested for plant barcoding (Kress et al. 2005 and references therein). A sub-sample of 146 individuals from throughout the study range was then genotyped as described above at *ccmp2* (the only polymorphic cpSSR, labelled with 6-FAM) and sequenced at *psbA-trnH* and *trnC-ycf6*. *Ccmp2* was amplified following the conditions of Weising & Gardner (1999). *PsbA-trnH* was amplified in 25 µl reactions with the Phusion polymerase (Finnzymes) following the manufacturer's protocol using the HF buffer. For *trnC-ycf6*, the PCR cocktail (25 µl) included 1X reaction buffer containing 1.5mM MgCl₂ (QIAGEN), 1 µl MgCl₂ at 25 mM, 0.2 mM of each dNTP, 0.1 µM of each primer,

0.625 units Taq polymerase (QIAGEN) and 1 μ l of DNA extract. Cycling conditions were: 94°C for 3 min, 35 cycles of 94°C for 20 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 1 min, followed by 72°C for 7 min and cooling to 10°C. PCR products were column-purified (QIAquick 96 PCR purification kit [QIAGEN] or MSB HTS PCRapace [Invitex, Berlin, Germany]) and sequenced using an ABI 3100 capillary sequencer (Applied Biosystems). Forward and reverse sequence trace files were merged and edited using the Staden package (<http://staden.sourceforge.net>). A site was considered a single nucleotide polymorphism (SNP) if different variants had at least a Phred quality value of 25, corresponding to an error probability of 3/1000. Haplotypes were defined over the two sequences and the single microsatellite region.

5.2.4. Data analysis

Genetic diversity at nSSRs. Populations with small sample sizes ($n < 10$) and one population separated by less than 100 km from two others were excluded, restricting genetic diversity analyses to 13 populations (Table 1): one in Benin (BE-2), seven in Cameroon (CA-1, CA-3, CA-4, CA-5, CA-6, CA-7, CA-8), one in the Central African Republic (CE-1), one in the Republic of the Congo (CO-1) and three in Gabon (GA-1, GA-3 and GA-4). We used GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1995) to compute expected heterozygosity H_E and FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 1995) to compute allelic richness R_S over loci in each population or genetic cluster (see below). The inbreeding coefficient F_{IS} was calculated in each population using FSTAT 2.9.3.2 and deviation from zero (Hardy-Weinberg genotypic proportions) was evaluated by permuting alleles within populations (5,000 permutations). F_{IS} provides information on the cumulative action of inbreeding, population substructure, and also potential null alleles.

Identification of genetic clusters at nSSRs. Genetic clusters in the data set were identified using the spatial Bayesian clustering algorithm implemented in TESS 2.1 (Chen et al. 2007). We first explored the upper bound of the number of clusters K under the no-admixture model with an interaction parameter $\psi = 0.6, 0.8$ or 1 (relative weight given to spatial positions and genotypes). The admixture model was then run to determine the best K , using $\psi = 0.3, 0.5, 0.7$ or 0.9 in order to account for different degrees of spatial autocorrelation, and a constant or a linear degree of the trend surface. Under each model and for each value of ψ and the degree of the trend surface, we performed 10 runs with a burn-in of 10,000 and a run length of 50,000 iterations for a number of clusters ranging from $K = 2$ to $K = 10$. The best K was determined as the one having the lowest deviance information criterion (DIC, Chen et al. 2007). Since the inference of genetic clusters can be affected by the presence of isolation-by-distance (IBD, usually due to restricted dispersal, Guillot et al. 2009), we specifically tested for IBD in the whole data set and in inferred clusters. Kinship coefficients for pairs of individuals were regressed on the logarithm of the spatial distance separating them and the resulting regression slope was compared to its distribution after 10,000 permutations of individual locations among individuals using SPAGeDi ver. 1.2.g (Hardy & Vekemans 2002).

Table 1. *Milicia excelsa* sampling locations (populations), estimates of genetic diversity at nuSSRs and assignment to genetic clusters determined with TESS. n , sample size; d_{ij} max (km), maximal within-population distance between two sampled individuals. R_s , allelic richness and its standard error (SE); H_E , gene diversity and its standard error (SE); F_{IS} , inbreeding coefficient; T_2 , bottleneck statistic (see materials and methods); TESS clustering: we report the number of the TESS cluster with the highest average proportion of ancestry of individuals, the mean individual proportion of ancestry in that cluster and the percentage of individuals assigned to that cluster following the >50% ancestry criterion.

Country	Population Code	Population name	n	d_{ij} max (km)	Nb of alleles	R_s (SE)	H_E (SE)	F_{IS}	T_2	TESS clustering		
										Cluster	Mean individual ancestry	% inds assigned (>50%)
Benin	BE-1	Bassila	5	0.1						1	0.753	100.0
	BE-2	Niaouli	15	102	37	3.93 (0.42)	0.557 (0.053)	0.056 ns	0.396 ns	1	0.780	86.7
Cameroon	CA-1	Belabo	78	39	57	4.11 (0.22)	0.558 (0.210)	0.146***	0.248 ns	2	0.927	98.7
	CA-2	Belabo-Mindourou	10	65						2	0.929	100.0
	CA-3	Biyeyem	52	77	55	4.12 (0.27)	0.544 (0.024)	0.198***	-0.305 ns	2	0.934	98.1
	CA-4	Djourn	54	166	53	3.89 (0.30)	0.527 (0.030)	0.193***	-0.155 ns	2	0.911	98.2
	CA-5	Gundi	15	71	39	4.09 (0.58)	0.525 (0.065)	0.154*		2	0.865	93.3
	CA-6	Makalaya	19	30	38	4.05 (0.38)	0.613 (0.033)	0.170***	1.282 ns	2	0.889	94.7
	CA-7	Megan	10	55	30	3.64 (0.82)	0.524 (0.085)	0.062 ns		2	0.913	90.0
	CA-8	Mindourou	112	55	55	3.86 (0.14)	0.553 (0.012)	0.184***	0.433 ns	2	0.950	99.1
	CA-9	Mt_Koupe	6	3						2	0.945	100.0
CAR	CE-1	Mboko	48	8	43	3.41 (0.23)	0.485 (0.033)	0.009 ns	-0.103 ns	2	0.965	100.0
RC	CO-1	Ipendja	21	9	39	3.66 (0.43)	0.531 (0.044)	0.074 ns	0.145 ns	2	0.894	95.2
	CO-2	Pokola	5	71						2	0.945	100.0
Gabon	GA-1	Ekarlong	11	83	26	3.13 (0.32)	0.533 (0.045)	0.126 ns		3	0.584	63.6
	GA-3	Lastourville	47	90	36	3.32 (0.22)	0.467 (0.032)	0.167 **	0.686 ns	2	0.625	68.1
	GA-4	Libreville	19	75	29	3.14 (0.39)	0.513 (0.053)	0.038 ns	2.151 *	3	0.677	79.0
	GA-5	Makokou	4	26						2	0.805	75.0
	GA-6	Mandji	6	13						3	0.694	83.3
	GA-7	Oyem	7	67						2	0.928	100.0
	GA-8	Popa	4	1						2	0.637	75.0

Genetic differentiation at nSSRs. Differentiation between pairs of populations or genetic clusters was computed using F_{ST} and tested with FSTAT 2.9.3.2. (Goudet 1995), and using R_{ST} and tested with SPAGeDi (Hardy & Vekemans 2002). To correct for multiple testing, significance levels were adjusted using the sequential Bonferroni procedure (Rice 1989). R_{ST} is an analogue of F_{ST} based on allele size which is expected to be larger than F_{ST} if stepwise mutations have contributed to differentiation, e.g., in the case of ancient isolation (Hardy et al. 2003). SPAGeDi was used to test if $R_{ST} > F_{ST}$, which is a test of a phylogeographic pattern using microsatellites mutating in a stepwise fashion.

Diversity and differentiation of cpDNA. A distance matrix was constructed among haplotypes based on the number of polymorphic characters that differed in state between each pair of haplotypes. This matrix was used to compute a statistical parsimony network with TCS (Clement et al. 2000) to visualize relationships among haplotypes. Genetic diversity was estimated as number of haplotypes and haplotypic diversity based on unordered (h) or ordered (v) haplotypes (Pons & Petit 1996) and differentiation was estimated using the corresponding statistics, G_{ST} for unordered and N_{ST} for ordered alleles, using the distance matrix for the computation of N_{ST} . Deviation of G_{ST} or N_{ST} from zero was tested by 10,000 permutations of individuals among populations. The impact of mutations on among-population differentiation, i.e., the presence of phylogeographic structure, was assessed by 10,000 permutations of pair-wise haplotype distances among pairs of haplotypes. All computations were performed with SPAGeDi.

Gene flow through seed and pollen dispersal. We used two approaches to estimate pollen versus seed dispersal from patterns of genetic variation at maternally (cpDNA) and biparentally (nuclear DNA) inherited markers. Both approaches were applied on samples from Cameroon, CAR and eastern Gabon because they constitute a single genetic cluster (Cluster 2, see results) and should be little influenced by historical factors. The first method estimates the pollen-to-seed migration ratio ($r = m_p/m_s$) based on differentiation among populations, F_{ST} (nDNA) and G_{ST} (cpDNA), as described in Petit et al. (2005): $r = [(1/F_{ST}-1)-2(1/G_{ST}-1)]/(1/G_{ST}-1)$ for hermaphrodites. Adjusting this formula for a dioecious species with an 1:1 breeding sex ratio (see Hamilton & Miller 2002), we obtain $r = [(1/F_{ST}-1)-4(1/G_{ST}-1)]/[2(1/G_{ST}-1)]$. The second method is based on the regression of pairwise kinship coefficients between individuals on the logarithm of the distance to estimate the Sp statistic, quantifying the strength of genetic structure (Vekemans & Hardy 2004). In dioecious plants with a balanced sex ratio, the Sp statistics are expected to approach $1/(4\pi D\sigma_g^2)$ for nuclear and $1/(\pi D\sigma_s^2)$ for chloroplast markers under IBD, where σ_g^2 and σ_s^2 are half the mean squared dispersal distance of genes and seeds, respectively, and D is the adult population density (both sexes). The relative contribution of seed dispersal to overall gene dispersal (σ_s/σ_g ratio) is then given by $[4Sp(\text{nuclear}) / Sp(\text{chloroplast})]^{1/2}$ and the pollen-to-seed dispersal distance ratio (σ_p/σ_s) is given by $[0.5 Sp(\text{chloroplast}) / 2Sp(\text{nuclear})-2]^{1/2}$. To compute the Sp statistics, the slope was assessed for distances inferior to 40 km as in Bizoux et al. (2009), to encompass a spatial scale adequate for indirect inferences of dispersal distances.

Exploration of demographic history. The ‘‘bottleneck’’ statistic $T2$ was computed for nuSSRs at the population level using Bottleneck 1.2.02 (Cornuet & Luikart 1997). It represents an average over loci of the deviation of the actual gene diversity H_E from the gene diversity expected from the number of alleles in the population, H_A , assuming mutation-drift equilibrium in a constant-size population. Positive values of $T2$ reflect a gene diversity excess possibly caused by recent bottlenecks or founder events, whereas negative values reflect a gene diversity

deficit consistent with recent population expansion. The computation was performed under an Infinite Allele Model (IAM), which is likely to be appropriate for the loci under study, given their low diversity and absence of contribution of stepwise mutations to differentiation (see results). The magnitude of gene diversity excess or deficit across loci was tested against equilibrium expectations using Wilcoxon signed ranks tests (Piry et al. 1999).

In Lower Guinea, we detected two genetic clusters centred, respectively, on Gabon and Cameroon, and a lower diversity in populations from Gabon than in those from Cameroon (see results). To identify demographic scenarios that could explain the current diversity patterns in the two regions, we used an Approximate Bayesian Computation approach (Beaumont 2008) implemented in the PopABC program (Lopes et al. 2009) based on TESS clusters. The low differentiation between genetic clusters, the estimated wide-ranging gene flow through both pollen and seeds and the considerable admixture in Gabonese populations (see results) motivated the choice of a model with two populations exchanging fairly high proportions of migrants. Therefore, the simulated model represented one ancestral population of effective size NeA that split at a time of tev years BP (generation time: 100 years) into two populations of effective sizes $Ne1$ and $Ne2$ with the same sample sizes as the TESS clusters, receiving proportions of migrants $mig1$ and $mig2$ from the other population. We generated 100,000 data sets for eight nSSRs and one cpDNA sequence and computed the following summary statistics of the real and the simulated data: the nSSR heterozygosities for populations 1 and 2, $H1$ and $H2$; the numbers of nuSSRs alleles in each population, k_{M1} and k_{M2} ; the differences between these statistics between populations, $H1-2$, k_{M1-2} ; the numbers of migrants estimated from $H1$ and $H2$, $NmH1$ and $NmH2$; for the cpDNA sequences, the average number of pair-wise differences between sequences in each population, $pi1$ and $pi2$, the numbers of segregating sites, $S1$ and $S2$, the numbers of different haplotypes k_{S1} and k_{S2} ; the numbers of migrants estimated from haplotypes $NmS1$ and $NmS2$, and the differences between populations for some of these statistics, $pi1-2$, $S1-2$ and k_{S1-2} (for details see the PopABC User Guide). The 1% simulated data sets that were closest to the real data were retained for the estimation of demographic parameters. We initially used wide priors and then narrowed the priors space to achieve better precision in the estimation (see Text S2 in the Supplementary material). We did not include populations from Upper Guinea in our model, because our fairly limited sample might not be representative of the genetic diversity found in that region.

5.3. Results

5.3.1. Nuclear microsatellites

Genetic diversity and inbreeding

In total, 84 alleles were identified at the 8 loci. Allelic richness was lower in populations from Gabon (R_s from 3.13 to 3.32) than in populations from Cameroon (R_s from 3.64 to 4.11) or Benin ($R_s = 3.93$), populations from CAR and RC having intermediate values (Table 1). Expected heterozygosity H_E ranged from 0.467 to 0.613 and there was a weak but similar trend of lower values in Gabon than in Cameroon or Benin (Table 1). Values of F_{IS} were positive for all 13 populations and the deviation from Hardy-Weinberg genotypic proportions was significant in seven of them (Table 1). As the species is dioecious and cannot self, significant deviation from zero essentially in Cameroonian populations should reflect biparental inbreeding, population substructure and/or the presence of null alleles.

Genetic structure

The no-admixture model in TESS identified an upper boundary of $K = 4$ clusters in the sample (results not shown). Using the admixture model, the lowest deviance information criterion (DIC) was observed with $\psi = 0.3$ and a linear trend degree surface for $K = 3$ clusters, centred, respectively, on Benin (Cluster 1), on Cameroon, CAR, RC and eastern Gabon (Cluster 2) and on western Gabon (Cluster 3; Figure 1, Table 1, see also Figures S3 and S4, Supporting Information). The distribution of Clusters 2 and 3 did not change when TESS was run on individuals from Lower Guinea only. Individuals with the highest ancestry in Cluster 3 were more admixed (mean individual ancestry 74.9%) than those from Cluster 1 (81.5%) or Cluster 2 (92.7%, Table 1). When assigning individuals to TESS clusters based on a $>50\%$ ancestry criterion, only one individual out of the 550 could not be assigned. Isolation by distance was accounted for in the TESS admixture model, and was indeed present in the overall data set ($P < 0.001$), in Cluster 2 ($P < 0.001$) and in Cluster 3 ($P < 0.05$).

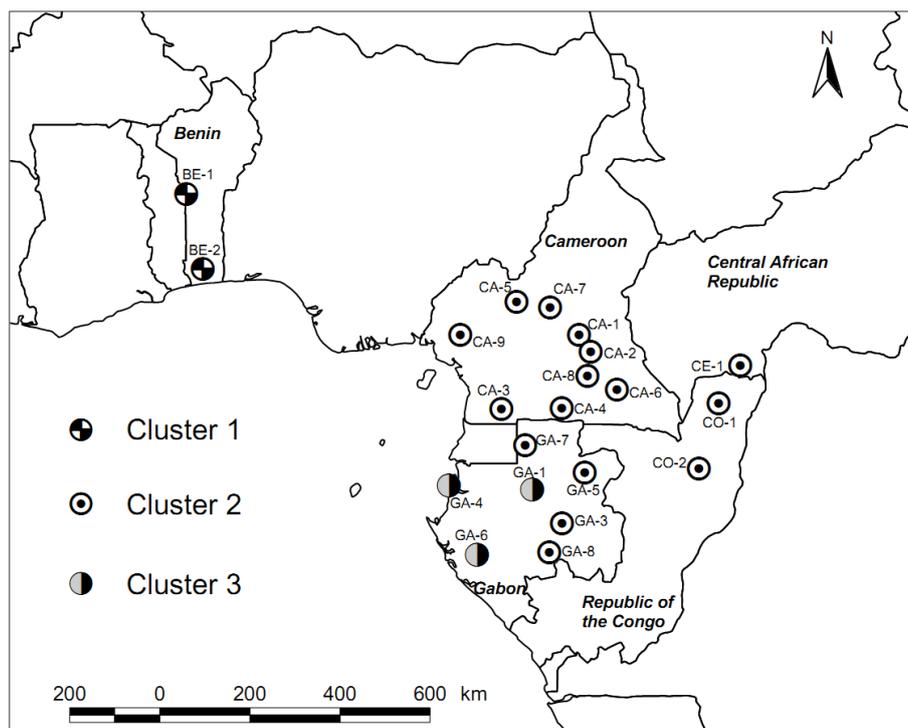


Figure 1. Sampling locations of *Milicia excelsa*. The three circle symbols represent the genetic clusters from the TESS program in which average individual ancestry was $>50\%$. Population GA-2 (three individuals) was not represented because it is not a geographically contiguous population (see Table S1, Supporting Information).

A major divide between samples from Upper Guinea (Benin) and those from Lower Guinea and a north-south divide within Lower Guinea were also detected using the non-spatial admixture model with correlated allele frequencies implemented in STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000, see Figures S1 and S2 in the Supplementary material) and under models of correlated or uncorrelated allele frequencies in GENELAND (Guillot et al. 2005, see Figure S5, Supporting Information). Patterns of genetic differentiation between populations (Table 2) or clusters (Table 3) confirmed the genetic structure. The population from Benin was strongly differentiated from all other populations (pairwise F_{ST} from 0.134 to 0.230, Table 2). Populations from Lower Guinea were weakly differentiated with $F_{ST} = 0.035$ across Lower Guinea, $F_{ST} = 0.013$ among populations

from Cluster 2 (Cameroon, CAR, RC and eastern Gabon) and $F_{ST} = 0.037$ among populations from Cluster 3 (western Gabon, Table 3).

At the population or cluster levels, R_{ST} was never significantly higher than F_{ST} , indicating absence of a phylogeographic signal at nuclear microsatellites. The allelic richness R_S was significantly lower in populations from western Gabon (Cluster 3) than in those from Cameroon (Cluster 2, two-sided p -value after 5.000 permutations: 0.006); the pattern for H_S was not significant (Table 3).

5.3.2. Chloroplast DNA

Alignment lengths in *M. excelsa* were 518 bp for *psbA-trnH* and 1026 bp for *trnC-petN1r* (Genbank accession numbers HM543747-HM544038). Twelve polymorphic sequence characters and four cpSSR variants defined fourteen haplotypes across 146 individuals (Table 4). Six haplotypes were found among 19 individuals belonging to two populations in Benin, while the remaining eight haplotypes were found among 127 individuals from 20 populations in the Lower Guinea region (Table 4, Figure 2a). Haplotypes in Benin and in Lower Guinea belonged to two distinct lineages (Figure 2b) without any exceptions. Allelic richness and haplotypic diversity were highest in Benin, followed by Gabon and finally Cameroon (Table 5). Genetic differentiation at cpDNA markers in the overall data set was $G_{ST} = 0.598$ and $N_{ST} = 0.799$. The test for phylogeographic structure was significant in the overall data set ($N_{ST} > N_{ST}$ [permuted], $P < 0.001$) and between Benin and Lower Guinea ($G_{ST} = 0.440$ and $N_{ST} = 0.830$, $N_{ST} > N_{ST}$ [permuted], $P < 0.001$) but not within Benin, Lower Guinea or any set of populations grouped according to TESS genetic clusters (Table 5), suggesting that the phylogeographic structure is due to the differentiation between populations from Benin and Lower Guinea. Similarly to nuSSRs, a north-south geographic distribution pattern of common haplotypes was nevertheless observed in Lower Guinea, with H06 centred on Gabon, and H02 and H05 with a wider distribution.

5.3.3. Gene flow through seeds versus pollen

Within Cluster 2, population differentiation reached $F_{ST} = 0.025$ at nuclear microsatellites and $G_{ST} = 0.57$ at chloroplast markers, leading to a pollen-to-seed migration ratio $r = m_p/m_s = 23.8$. The strength of SGS up to 40 km reached $Sp = 0.0031$ at nSSRs and $Sp = 0.032$ at cpDNA, leading to a pollen-to-seed dispersal distance ratio (σ_p/σ_s) = 1.76.

Table 2. Pairwise genetic differentiation between populations estimated with F_{ST} . *, $P < 0.05$ after multiple test correction; ns, non significant.

		Cluster 1		Cluster 2								Cluster 3		
F_{ST}		Benin		Cameroon				CAR	RC	Gabon	Gabon			
		BE-2	CA-1	CA-3	CA-4	CA-5	CA-6	CA-7	CA-8	CE-1	CO-1	GA-3	GA-1	GA-4
Cluster 1	Bénin	BE-2	0.134 *	0.144 *	0.149 *	0.167 *	0.159 *	0.156 *	0.146 *	0.165 *	0.169 *	0.194 *	0.190 *	0.230 *
Cluster 2	Cameroon	CA-1		0.021 ns	0.012 ns	0.012 ns	0.026 ns	0.002 ns	0.008 *	0.008 *	0.018 ns	0.065 *	0.093 *	0.101 *
		CA-3			0.002 ns	0.025 ns	0.019 ns	0.019 ns	0.013 ns	0.021 *	0.001 ns	0.069 *	0.094 *	0.088 *
		CA-4				0.014 ns	0.018 ns	0.013 ns	0.013 *	0.009 *	0.001 ns	0.073 *	0.090 *	0.089 *
		CA-5					0.033 ns	0.011 ns	0.016 ns	0.016 ns	0.009 ns	0.055*	0.065 ns	0.096 *
		CA-6						0.035 ns	0.007 ns	0.040 *	0.011 ns	0.109*	0.085 *	0.102 *
		CA-7							0.022 ns	0.024 *	0.017 ns	0.084*	0.124 *	0.104 *
		CA-8								0.009 *	0.011 *	0.069*	0.090 *	0.108 *
		CAR	CE-1									0.010 ns	0.070 *	0.110 *
RC	CO-1										0.069 *	0.078 *	0.065 *	
Gabon	GA-3											0.059 *	0.065 *	
Cluster 3	Gabon	GA-1												0.037 *
		GA-4												

Table 3. Genetic diversity and differentiation at nSSRs for three clusters obtained with TESS. Individuals were assigned to the cluster in which their membership was > 50%. * $P < 0.05$.

Clusters	R_S	H_S	F_{IS}	F_{ST}	Differentiation between clusters (F_{ST})	
					Cluster 2	Cluster 3
when each cluster is considered as a population						
Cluster 1 (N = 18 inds)	4.985 ^a	0.566	0.074	–	0.158 *	0.251 *
Cluster 2 (N = 478 inds)	4.749 ^a	0.541	0.154	–	–	0.102 *
Cluster 3 (N = 53 inds)	4.092 ^a	0.513	0.165	–	–	–
when each cluster is made by different populations						
Cluster 1 (N = 1 population)	3.930 ^b	0.557	0.056	–	–	–
Cluster 2 (N = 10 populations)	3.814 ^b	0.534	0.150	0.025	–	–
Cluster 3 (N = 2 populations)	3.131 ^b	0.520	0.070	0.037	–	–

^a Based on a sample size of 15 diploid individuals^b Based on a sample size of 9 diploid individuals**Table 4.** CpDNA haplotype definition and frequencies. Character states were determined in outgroups where available. *: the fragment length for *cmp2* was determined by comparison to an internal sizing standard in *Milicia excelsa* and from the entire chloroplast DNA sequence in *Morus indica*. nd, not determined; I, I1, I2, insertions; -, absence of the insertion.

Hap	n	<i>trnC-ycf6</i>						<i>psbA-trnH</i>					<i>cmp2</i> bp	
		28	140	335	430	483	660	124	303	304	326	346		381
H01	2	A	G	A	-	-	C	TTGTTCTATCAC	T	T10	(TTTAATTTTA)1	I	T	256
H02	90	A	G	A	-	-	C	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)1	I	T	256
H03	1	A	G	A	-	-	C	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)1	I	T	257
H04	1	C	G	A	-	-	C	INV	A	T9	(TTTAATTTTA)1	I	T	262
H05	9	C	G	A	-	-	C	TTGTTCTATCAC	A	T9	(TTTAATTTTA)1	I	T	256
H06	22	C	G	A	-	-	C	TTGTTCTATCAC	A	T9	(TTTAATTTTA)1	I	T	262
H07	1	C	G	A	-	-	C	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)1	I	T	256
H08	1	C	T	A	-	-	C	TTGTTCTATCAC	A	T9	(TTTAATTTTA)1	I	T	256
H09	1	C	G	G	-	-	A	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)2	I	G	263
H10	3	C	G	G	-	I1	A	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)2	I	G	256
H11	11	C	G	G	-	I1	A	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)2	I	G	263
H12	2	C	G	G	-	I2	A	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)1	-	G	256
H13	1	C	G	G	-	I2	A	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)2	I	G	256
H14	1	C	G	G	I	I2	A	TTGTTCTATCAC	T	T9	(TTTAATTTTA)2	I	G	263
<i>Morus indica</i>		C	G	A	-	-	C	nd	-	-	-	-	-	255*
<i>Ficus</i> sp.		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	G	nd

Table 5. Genetic diversity and differentiation statistics for cpDNA. Populations are grouped by geographical regions or by TESS clusters. N , number of populations; n , sample size per population; A_S , average number of alleles per population; h_S and v_S , average gene diversity per population based on unordered and ordered alleles, respectively; A_T , total number of alleles; h_T and v_T , total gene diversity based on unordered and ordered alleles; G_{ST} and N_{ST} , genetic differentiation based on unordered and ordered alleles; P -value of $H1: N_{ST} > N_{ST}(perm.)$: P -value of the test for phylogeographic structure.

Region	N	n	A_S	h_S	v_S	A_T	h_T	v_T	G_{ST}	N_{ST}	P -value of $H1: N_{ST} > N_{ST}(perm.)$
Benin (Cluster 1)	2	9.50 (6.36)	3.50 (2.12)	0.597	0.072	6	0.743	0.081	0.197	0.119	ns
Cameroon, CAR, RC and eastern Gabon (Cluster 2)	17	6.41 (6.38)	1.59 (0.79)	0.271	0.050	8	0.631	0.116	0.570	0.570	ns
Western Gabon (Cluster 3)	3	6.00 (4.00)	2.00 (1.00)	0.400	0.075	3	0.467	0.088	0.143	0.146	ns
Lower Guinea (Clusters 2 & 3 together)	20	6.35 (6.00)	1.65 (0.81)	0.294	0.054	8	0.596	0.110	0.506	0.505	ns
Total	22	6.64 (5.95)	1.81 (1.05)	0.326	0.056	14	0.677	0.190	0.519	0.705	0.001

5.3.4. Exploration of demographic history

The bottleneck statistic showed a significant gene diversity excess (positive T_2) in population GA-4 in coastal Gabon (Table 1), suggesting that this population may have suffered a recent bottleneck or founder event, while other populations did not deviate from the null hypothesis of stable size.

Demographic scenarios of two populations exchanging migrants simulated in an Approximate Bayesian Computation framework provided fairly reliable estimates of mutation rates, but for all other parameters (Ne_1 , Ne_2 , mig_1 , mig_2 , NeA and tev) a wide range of values remained compatible with the *M. excelsa* data (Figure 3, Figures S8, S9 and S10 in the Supplementary material). Relatively independently of the priors space, mutation rates were found to be low for nuSSRs and cpDNA, both on the order of 10^{-5} to 10^{-6} per generation per locus (e.g., Figure 3, Text S2 in the Supplementary material). For cpDNA, this translates into a mutation rate on the order of 5.5×10^{-9} to 5.5×10^{-10} per nucleotide. Narrowing the priors space (Text S2 in Supporting Information), we found an optimum for NeA between 80,000 and 200,000 and divergence times, tev , of ca. 150,000 years or more (two glacial stages before present [Petit et al. 1999], Figure 3). There was a weak trend of a smaller Ne_2 (in Gabon) than Ne_1 (in Cameroon) but the estimation of relative population sizes and migration rates remained imprecise (Figures S6 and S7 in the Supplementary material).

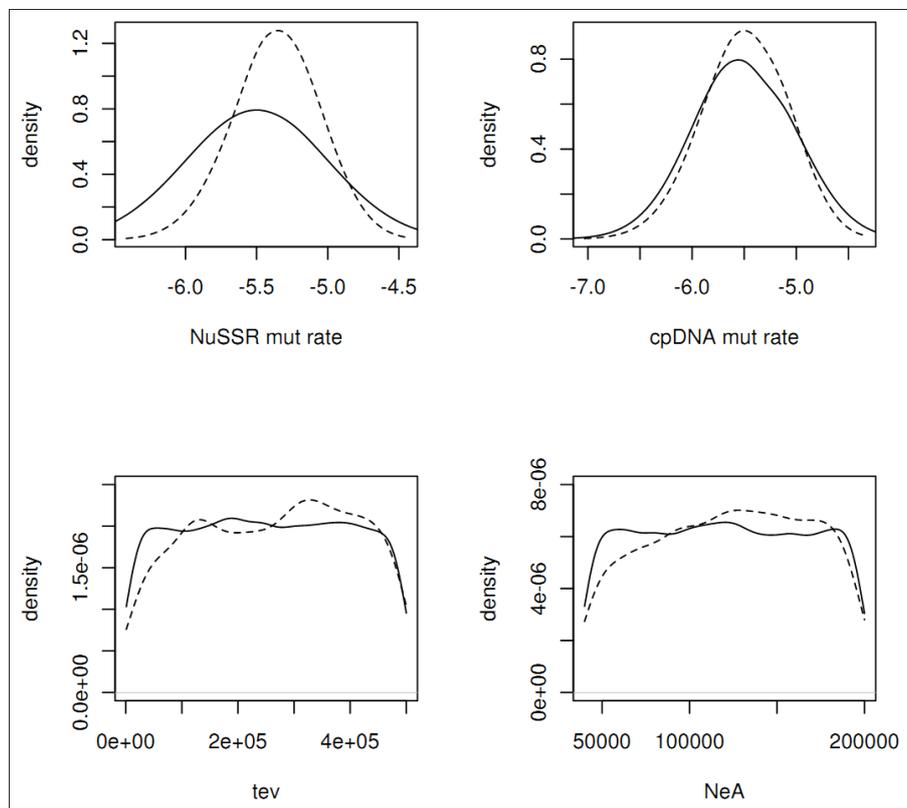


Figure 3. Prior and posterior density distributions of nSSR and cpDNA mutation rates, divergence time (tev in years) between two populations exchanging migrants, and ancestral population size NeA in *Milicia excelsa* from Lower Guinea, obtained from the popABC program (Lopes et al. 2009, see Materials and Methods). The 1,000 data sets retained for the posterior distributions correspond to the 1% simulated data sets that had summary statistics closest to the observed genetic data.

5.4. Discussion

Despite the continuous range of *Milicia excelsa* from West to Central Africa, both nuclear and chloroplast DNA data concurred in showing a deep genetic divide between populations from Benin and those from Lower Guinea, with a remarkable absence of shared haplotypes between the two regions at cpDNA. Within Lower Guinea, genetic structure was less marked, but a north-south divide was inferred from both markers types, with one gene pool centred on Cameroon and the other on West Gabon. The Gabonese cluster had lower nuSSR polymorphism than the Cameroonian one and a bottleneck event was detected in one West Gabonese population.

5.4.1. Gene flow through seed versus pollen

Bizoux et al. (2009) inferred from the spatial genetic structure of *M. excelsa* populations from Cameroon that genes were typically dispersed over several kilometres but they could not assess the relative contribution of seed versus pollen dispersal. Pollen-to-seed migration rates among populations from Cluster 2 (based on F_{ST}) suggested a high gene flow asymmetry, with a ca. 25 times larger contribution of pollen than seeds, a figure often observed in other species (Petit et al. 2005). By contrast, spatial genetic structure among individuals suggested a ratio of pollen-to-seed dispersal distances of 1.76. This discrepancy may result from the difference of scale: F_{ST} was estimated among populations separated by 100 to 800 km while Sp was estimated over distances <40 km. These results may reflect a biological reality if dispersal kernels of seed and pollen are not only different in extent but also in shape. Under this hypothesis, the ratio of pollen to seed migration rates should be scale dependent. However our results may also reflect an artefact because these inferences assume, among other things, drift-dispersal equilibrium, which may not be reached, especially over large geographic scales (Guillot et al. 2009). Therefore, we believe that the Sp -based ratio of pollen-to-seed dispersal distances is more reliable. It suggests that in established populations, both seeds and pollen are regularly dispersed over several kilometres by bats and wind, contributing efficiently to genetic homogenization within regions.

5.4.2. Usefulness of Approximate Bayesian Computation for demographic inference in *M. excelsa*

The ABC model of two sister populations exchanging migrants in Lower Guinea provided fairly reliable estimates of mutation rates of 10^{-5} to 10^{-6} per generation per locus for both markers, at least one order of magnitude lower than direct estimates for nSSRs in plants (e.g., Thuillet et al. 2002). Accordingly, genetic diversity at nSSRs was low in *M. excelsa* with $He = 0.53$ (see also Bizoux et al. 2009, Ofori et al. 2001) compared to the average of $He = 0.62$ for wide-ranging plants (Nybom 2004). For all other parameters estimated by ABC, a large range of values remained compatible with the observed data. An estimate of ca. 10^5 was obtained for effective population size NeA in Lower Guinea, similarly to the Ne of 9.4×10^4 in *Pinus taeda*, a conifer with a wide range in the Southeastern United States (Willyard et al. 2006). The difficulty to estimate most demographic parameters is probably related to the presence of immigration: Beaumont (2008) showed that even with 329 microsatellite loci, almost no information was obtained on divergence times beyond the topology of the genealogy of three human populations. ABC methods may not be well suited for genetically similar populations freely exchanging migrants, but they have proved to be a valuable tool for demographic inference in genetically contrasted or isolated populations, for instance after colonisation or invasion of a new range (e.g. Pascual et al. 2007). ABC may become more practicable in phylogeography if independent demographic or

palaeoecological information can guide the construction of informative priors (Beaumont 2008). This information is unfortunately still limited in most tropical trees.

5.4.3. Genetic divide between *Milicia excelsa* populations from the Upper and the Lower Guinea

An important genetic divide between *M. excelsa* populations from Upper and Lower Guinea was observed at both cpDNA ($G_{ST} = 0.440$ and $N_{ST} = 0.830$ between the two regions) and nSSRs (pairwise F_{ST} of 0.158 to 0.251 between populations from Benin and Lower Guinea). Both regions had endemic nSSR alleles: 7 in Benin and 40 in Lower Guinea, where the sampling effort was much larger. Distinct cpDNA lineages and a phylogeographic signal indicated a prolonged separation of both gene pools with accumulation of new mutations. No phylogeographic signal was detected with nSSRs (R_{ST} not significantly different from F_{ST}) despite the clear discontinuity in genetic variation revealed by Bayesian clustering algorithms. This may simply indicate that the nSSRs used in *M. excelsa* may not follow a stepwise mutation model (Hardy et al. 2003).

Our results suggest that West and Central African populations diverged due to geographical isolation and that gene flow was too weak to homogenize the two gene pools despite (a) a continuous geographic distribution, (b) an extensive gene flow in Cameroon (Bizoux et al. 2009) and (c) seed-dispersal by bats and parrots (Osmaston 1965; Taylor et al. 1999; cf. chapter 7). These data support to some extent the forest refuge hypothesis in tropical Africa, according to which forests were fragmented and forest taxa survived in refugia during the cold and dry periods of the Pleistocene, especially from 160,000 - 130,000 years BP and from 24,000 - 12,000 years BP (Maley 1996). Under the forest refuge hypothesis, Beninese populations of *M. excelsa* may have colonized from the Upper Guinean forest refugia located in three forest zones from Liberia to Ghana (Maley 1996). Populations from Lower Guinea might be the result of expansion from refugia in Lower Guinea and Congolia. If according to our simulations, genetic clusters within Lower Guinea diverged more than 100,000 years ago, then the isolation between West and Central African gene pools amounts to a substantially longer time, probably earlier than the last two cold stages.

Whether the model of forest fragmentation and refugia readily applies for *M. excelsa* is, however, debatable because *M. excelsa* is a light-demanding species with a broad ecological amplitude that can prosper in fairly open forest habitats. There is some evidence that *M. excelsa* may have benefited from past forest regressions: fossil pollen data attested a strong expansion of *Milicia* following a severe drought event with a catastrophic forest decline about 2,500 BP in West Cameroon (Maley & Brenac 1998). A similar forest regression occurred around 3,700 years BP opening the Dahomey Gap (Ghana to Benin, Maley 1999), but there is no clear proof of *Milicia* population expansion during that period. Even if Holocene forest regressions could have favoured an expansion of *M. excelsa*, the mixture of alleged vicariant gene pools should have been delayed by the considerable distance of ca. 2,000 km between West and Central African forest refugia and the long generation time of the species (close to 100 years, considering that regular fruit set occurs at a mean diameter of 55 cm and annual growth rate ranges from 3 mm/year [for seedlings] to 7 mm/year in Central African forests; K. Dainou, unpublished results).

Although slow colonization due to long generation time may retard the admixture of recolonizing gene pools, it does not explain why, despite *M. excelsa*'s adaptation to long-distance dispersal (Bizoux et al. 2009), we did not find any Upper Guinean haplotype in Lower Guinea. Sampling bias is an unlikely explanation because we analyzed an extensive sample from the latter region. While genetic analyses of *M. excelsa* populations in Nigeria

(region between Benin and Central Africa) are needed to better characterize this sharp discontinuity, the reason for it may relate to a preferential direction of migration of *M. excelsa*'s main seed disperser, the fruit bat *Eidolon helvum* (Taylor et al. 1999; cf. chapter 7). *E. helvum* is a migrant mammal with a wide distribution from West to Central, East and South Africa. From its prime habitat (the tropical forests and neighbouring islands), it seasonally migrates towards drier vegetation in the North and South of the continent (DeFrees & Wilson 1988; Robinson et al. 2005). Thomas (1983) observed that these bats move seasonally into the savannah zone in West Africa, i.e. northwards. Richter & Cummings (2008) showed that *E. helvum* colonies of Kasanka in Zambia migrate periodically north-westward. Therefore, it is possible that the preferred direction of migration of *E. helvum* is closer to a North-South than to an East-West axis. Under this hypothesis, we should expect more genetic differentiation in *M. excelsa* along the East-West than along the North-South axis. This highlights the need to study both the genetic structure of *M. excelsa* throughout its natural range and the movements of this fruit bat.

5.4.4. Demographic processes affecting *M. excelsa*'s genetic structure in the Lower Guinea

Both nSSRs and cpDNA suggested a north-south genetic divide within Lower Guinea. No cpDNA phylogeographic structure was detected in this region, suggesting that isolation between northern and southern gene pools is not as old as between Upper and Lower Guinea. The cpDNA haplotype H02 was most common in Cameroon and had a wide distribution, so that it may have expanded from refugia in West Cameroon (Maley & Brenac 1998). H06 was the most frequent haplotype in Gabon, CAR and in RC, but it was not observed in Cameroon, suggesting that it has colonized from a refuge located in Gabon or the Congo region. Similar north-south divides at cpDNA markers have been observed in this region for other tropical forest trees: the secondary forest trees *Aucoumea klaineana* (Muloko-Ntoutoume et al. 2000) and *Erythrophleum suaveolens* (Duminil et al. 2010) and *Greenwayodendron suaveolens* subsp. *suaveolens*, typical of mature forests (Dauby et al. 2010). These patterns probably result from past forest fragmentation during the Pleistocene.

nSSRs led to the identification of two gene pools in Lower Guinea, centred on Cameroon and on West Gabon, respectively, and allowed some insight into past demographic processes in the region. Populations from the Cameroonian region had a higher nuSSR polymorphism than those from Gabon. Although diversity statistics could be downward biased due to null alleles (Chapuis et al. 2008), this pattern remains robust because null alleles were mostly suspected in Cameroon (results not shown). The north of Lower Guinea was genetically fairly homogeneous ($F_{ST} = 0.013$), however in Gabon among-population differentiation was higher ($F_{ST} = 0.059$, see also Table 2), individuals were more admixed (Figure S6) and a recent bottleneck was detected in population GA-4. These results suggest genetic depauperation, disrupted gene flow processes and introgression in *M. excelsa* from western Gabon. A similar pattern with distinct gene pools in the north and the south of Lower Guinea as well as lower allelic richness and gene diversity in Gabon was found in another light-demanding tree, *Distemonanthus benthamianus* (Debout et al. 2010). In *M. excelsa*, the genetic patterns in West Gabon may well be related to the relatively recent establishment (500-1,000 years BP) of a closed canopy forest in coastal Gabon (Delègue et al. 2001). The presence of *M. excelsa* in Gabonese forests has probably been favoured by forest perturbations: similarly to West Cameroon where a drought episode around 2,500 BP led to general forest decline but to expansion of *M. excelsa* (Maley & Brenac 1998), the species should also have expanded in Gabon during several climatic deteriorations (around 2,800 years BP and from 1,400 to 500 years BP; Giresse et al.

2008, Ngomanda et al. 2007). The recent closing of the canopy (Delègue et al. 2001; Bonnefille 2007; Giresse et al. 2008) may negatively affect *M. excelsa*'s reproductive system by impeding wind-mediated pollen flow: JL Doucet (personal observation) noticed that *M. excelsa* sets fruit weakly in some Gabonese forests. Pollen limitation may be a more parsimonious explanation for the signs of genetic erosion observed in population GA-4 than a depauperation due to human activities, since fragmentation or exploitation do not always have a clear negative effect on genetic diversity (Pautasso 2009).

5.4.5. Recommendations for the management and conservation of genetic resources from *Milicia excelsa*

The IUCN Red List of threatened species ranges *Milicia excelsa* in the category "Lower Risk/near threatened", which means this taxon is close to being qualified as vulnerable. At the scale of the sub-region, Ofori et al. (2001) showed in West Africa that some *M. excelsa* populations in wet evergreen and dry semi-deciduous forests display low genetic diversity (when using Random Amplified Polymorphic DNA markers). One of their recommendations was to suspend logging in the concerned regions. We showed that a low level of genetic diversity seems to be a characteristic of the species as a whole and may not be alarming *per se*. For instance, a similarly low genetic diversity at nSSRs was for instance also observed in another widespread tree in the West and Central African rainforests, *Distemonanthus benthamianus* (Debout et al. 2010). However, considering the strong structure and the genetic depauperation detected some Gabonese populations (probably as a consequence of unsuitable environmental conditions), special attention should be paid to *M. excelsa* genetic resources from this region. Seeds should be collected in the Gabonese populations and used for reforestation activities in more convenient sites, outside the evergreen forest zone of Gabon.

Acknowledgments

This study was funded by Gembloux Agro-Bio Tech (Belgium) via Project PPR 10.000, by the Fund for Scientific Research of Belgium (F.R.S.-FNRS) via grant FRFC no. 2.4576.07 and by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) via the IFORA (ANR-BIODIV program). We thank Laurent Grumiau (ULB, Belgium) for technical assistance in the laboratory and Armand Boubady, Charlemagne Nguembou, Crépin Djopamdé, Elie Montchowui, Emerand Gassang, Emilien Dubiez, Fidel Baya, Gabriel Debout, Jean-François Gillet, Jérôme Duminil, Jérôme Laporte, Michel Arbonnier, Nils Bourland, Paul Zok, Pierre-André Ntchandi-Otimbo, Pierre Agbani, Santiago C. González-Martínez, Sylvie Gourlet-Fleury and Théophile Ayol for their contribution to the sample collection. We also acknowledge the logging companies Pallisco, SFID, Wijma (Cameroon) and CEB, CBG (Gabon), the Missouri Botanical Garden (Central African Program), the CENAREST (Gabon), the Smithsonian Institution (Gabon Biodiversity Program), Patrice Ipani (ENEF, Gabon), Bonaventure Sonké (Université de Yaoundé I, Cameroon) and Charles Doumenge (CIRAD) for facilitating field work and sample collection. Thanks are extended to P.C. Grant for assistance with the editing of the manuscript. The Staden software and PopABC simulations were run at the computing facilities of the Belgian EMBnet Node. MH acknowledges Postdoctoral Researcher positions funded by the FNRS and the Spanish Ministry for Science and Innovation (JAE-Doc program), and a scientific visit to the Royal Botanic Gardens, Kew, funded by the EU Synthesys programme (GB-TAF-1305).

6. Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in this low density African tropical tree (Article 4)

Jean-Philippe Bizoux¹, Kasso Daïnou¹, Nils Bourland, Olivier J. Hardy, Myriam Heuertz, Grégory Mahy, Jean-Louis Doucet

Molecular Ecology **18**, 4398-4408

Abstract. In this study, we analyzed spatial genetic structure (SGS) patterns and estimated dispersal distances in *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg (Moraceae), a threatened wind-pollinated dioecious African tree, with typically low density (~10 adults/km²). Eight microsatellite markers were used to type 287 individuals in four Cameroonian populations characterized by different habitats and tree densities. Differentiation among populations was very low. Two populations in more open habitat did not display any correlation between genetic relatedness and spatial distance between individuals, whereas significant SGS was detected in two populations situated under continuous forest cover. SGS was weak with a maximum Sp-statistic of 0.006, a value in the lower quartile of SGS estimates for trees in the literature. Using a stepwise approach with Bayesian clustering methods, we demonstrated that SGS resulted from isolation by distance and not colonization by different gene pools. Indirect estimates of gene dispersal distances ranged from $\sigma_g = 1$ to 7.1 km, one order of magnitude higher than most estimates found in the literature for tropical tree species. This result can largely be explained by life-history traits of the species. *Milicia excelsa* exhibits a potentially wide-ranging wind-mediated pollen dispersal mechanism as well as very efficient seed dispersal mediated by large frugivorous bats. Estimations of gene flow suggested no major risk of inbreeding because of reduction in population density by exploitation. Different strategy of seed collection may be required for reforestation programmes among populations with different extent of SGS.

Keywords: Central Africa, effective population density, gene dispersal, iroko, *Milicia excelsa*, spatial genetic structure

¹ It is mentioned in the original paper that "these authors have equally contributed to the study".

6.1. Introduction

A quantitative understanding of the genetic dynamics of threatened and/or overexploited plant populations is fundamental for conservation. Seed and pollen dispersal are the two primary factors dictating genetic patterns in plant populations. In tropical tree species, indirect approaches may be required to infer dispersal (Smouse et al. 2001; Smouse & Sork 2004; Burczyk & Koralewski 2005). Over time, the interaction of pollen and seed-mediated gene flow with local genetic drift produces patterns of spatial genetic structure (SGS) for neutral molecular markers (Vekemans & Hardy 2004; Hardy et al. 2006; Dick et al. 2008). Average gene dispersal distances over a few generations can therefore be provided by SGS patterns (Hardy & Vekemans 1999; see below). These data are particularly valuable for management because dispersal is a highly stochastic process, determined by the abundance and behaviour of seed and pollen dispersal vectors, which may vary between years and populations (Nathan et al. 2000; Muller-Landau et al. 2008). SGS has been detected at several spatial scales in tropical and temperate tree species, and the degree of structure varied significantly because of seed and pollen dispersal vectors (Vekemans & Hardy 2004; Luna et al. 2005; Hardy et al. 2006; Dick et al. 2008).

Demographic parameters, such as tree density and spatial distribution, may also affect SGS in tree populations (Doligez et al. 1998; Born et al. 2008). Tree density is expected to play a major role in SGS because low densities, exhibited by most tropical tree species, should result in increased SGS because of higher local genetic drift (Vekemans & Hardy 2004; Jump & Penuelas 2006). However, a significant number of studies on tropical tree species (e.g. White et al. 2002; Hardy et al. 2006; Born et al. 2008; Dick et al. 2008; Hanson et al. 2008) showed that decrease in tree densities could be correlated to an increase in gene dispersal distances, possibly through enhanced pollen flow, reducing SGS. For example, in an African tropical tree, Born et al. (2008) found an absence of fine-scale SGS variation among populations with different natural or anthropogenic variation in density and suggested that enhanced gene flow may compensate for lower population density.

Moreover, landscape features, including habitat availability, suitability and distribution; and the effects of human land use may influence dispersal capacities and demographic parameter. Seed and pollen dispersal distance as well as density and spatial distribution may vary according to vegetation type and habitat cover (habitat openness) (Born et al. 2008; Hanson et al. 2008). These factors can offset the effect of genetic drift and modify SGS (Epperson 2000; Born et al. 2008). Therefore, the characterization of SGS in populations from different landscape may be a good strategy to understand factors influencing the range of gene flow in a species.

Spatial genetic structure can be characterized by the decay in kinship coefficients between pairs of individuals as a function of the physical distance separating them (kinship-distance curve, reviewed by Vekemans & Hardy 2004). An indirect estimate of gene dispersal distance, σ_g , can be obtained from the regression slope if the SGS results from an isolation-by-distance (IBD) process at drift-dispersal equilibrium and if information on effective population density is available (Rousset 2000; Hardy et al. 2006). In addition, the initial curvature of the kinship-distance curve may provide insights into the relative contribution of pollen and seed dispersal to overall gene flow (Heuertz et al. 2003).

However, SGS does not necessarily reflect IBD at drift-dispersal equilibrium (Epperson 2000). It can reflect demographic fluctuations or recent colonization (Gapare & Aitken 2005; Troupin et al. 2006). The origin of SGS (IBD vs. colonization history) can be established by a stepwise approach as proposed by Born et al. (2008). First,

genetic homogeneity of each population may be tested using Bayesian clustering methods that detect potential different gene pools. Second, kinship-distance regression may be used to quantify the extent of SGS within populations.

Despite recent advances in our understanding of the genetic dynamics in plant species, current studies are far from depicting the spectrum of diversity in population structure, life-history traits and evolutionary history of tropical trees (Hardy et al. 2006; Dick et al. 2008). Here, we assess SGS and gene flow in *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg (Moraceae), an important African tropical timber tree species (trade name 'iroko'), which exhibits original life-history characteristics, i.e. very low density and wind-pollination. While most SGS studies of tropical tree have been conducted on insect-pollinated species, *M. excelsa* is wind-pollinated (Jøker 2002). Its seeds are mainly dispersed by frugivorous bats, but squirrels, anomalures or parrots can also act as dispersers (Osmaston 1965; Taylor et al. 1999). In a large part of the study area in southern Cameroon, *M. excelsa* populations naturally occur at low densities of 2-20 trees/km² (dbh \geq 30 cm, Fétéké et al. 2004; FORM Ecology Consultants 2004), substantially lower than most tropical tree species, previously studied (50-600 trees/km², Dick et al. 2008). Furthermore, the species is native to different tropical climates, forest types (forest-savannah mosaic, dry forest, moist evergreen and semi-evergreen forest) and landscapes. The abundance and density of *M. excelsa* vary significantly according to geographical location, forest type (Nichols et al. 1998) and/or human land use histories. In many countries, *M. excelsa* has been harvested from natural forests for decades, often at unsustainable rates (Ofori & Cobbinah 2007) and is registered in the IUCN Red List as 'Near Threatened'.

In this study, we investigated SGS in *M. excelsa*, a tropical wind-pollinated dioecious tree species with animal dispersed seeds. Our aims were: (i) to examine the variation of SGS extent in four populations distributed in regions differing in density and degree of habitat openness, to understand factors affecting local genetic structure in the species; (ii) to separate cause of SGS (IBD and mixing of gene pool; and (iii) to infer gene dispersal distance in populations that exhibited SGS pattern consistent with IBD.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Study species

Milicia excelsa (Welw.) C.C. Berg (Moraceae) is a species of large dioecious and deciduous trees native to sub-Saharan Africa. *Milicia excelsa* is commercialized under the trade name 'iroko'. According to White (1966), *M. excelsa* extends from the Ivory Coast and Ghana through Angola, Central and East Africa to Mozambique. *Milicia excelsa* is the only species of *Milicia* occurring in Cameroon (Bosu et al. 2006; Ofori & Cobbinah 2007). The species has been described as light demanding (Jøker 2002; Doucet 2003). The inconspicuous male flowers arranged in pendulous catkins indicate that the species is wind-pollinated, and flowering occurs at the end of the dry season when the trees are leafless (Jøker 2002). Females produce fleshy fruit (length: 55.7 ± 11.0 mm, width: 19.2 ± 4.2 mm, weight: 19.6 ± 5.1 g), containing small seeds (78.2 ± 109.1 seeds/fruit) (Nichols et al. 1999). Seeds are primarily dispersed by the large frugivorous bat *Eidolon elvum* Kerr (Osmaston 1965; Taylor et al. 1999). Additional seed dispersers are squirrels (*Paraxerus* sp.), an anomalure (*Anomaluris peli*) and parrots (*Poicephalus gulielmi*, *Psittacus erithacus* and *Agapornis swindernianus*; cf. chapter 7). Bats can disperse seeds over long distance as they can forage at distance up to 60 km from the roost. In migration periods, bats can travel on average 90 km/day with a maximal distance of 150 km (Richter & Cumming 2008). *Milicia excelsa*

individuals can be up to 50-m tall with a diameter not exceeding 200 cm (c. 250 years). *Milicia excelsa* is one of the five most intensively logged trees in Cameroon (Amariei 2005). Iroko stands were estimated to have declined in the last decades because of poor regeneration coupled with excessive levels of exploitation (Ofori & Cobbinah 2007).

6.2.2. Sampling and study sites

We collected leaf or cambium samples of 287 *M. excelsa* individuals in four different regions in south Cameroon: Belabo, Mindourou, Djoum and Biyeyem with respectively 78, 104, 54 and 51 individuals sampled (Fig. 1). Individuals were mostly sampled in the vicinity of forest tracks accessible by vehicle. According to field observation, the spatial distribution of the species appeared rather well spread within each region except in Biyeyem where individuals seemed to be essentially located nearby disturbed zones (roads, secondary forests). Although the range of this species is continuous in southern Cameroon, we considered individuals from each region as a different population in relation to differences in demographic characteristics and landscape features (density, habitat openness). The minimum distance between samples from distinct populations was ~100 km, and the maximum distance between samples within populations was ~60 km, with the exception of Djoum where it reached 150 km. Mindourou and Djoum are located in the East Province of Cameroon, respectively northeast and south of the Dja Wildlife Reserve. The vegetation is dominated by moist semi-evergreen forest rich in lianas (White 1966) and the climate is equatorial with two rainfall peaks and a dry season of 3 months (White 1983; Sonke 1998). The Biyeyem population is located east of the Campo-Ma'an National Park in the transition zone between semi-evergreen and coastal evergreen rainforest (White 1966). The Belabo population is located to the north of the East Province of Cameroon, in an area characterized by forest-savanna mosaic vegetation (transition zone forest, White 1966) with a longer dry season (5-6 months).

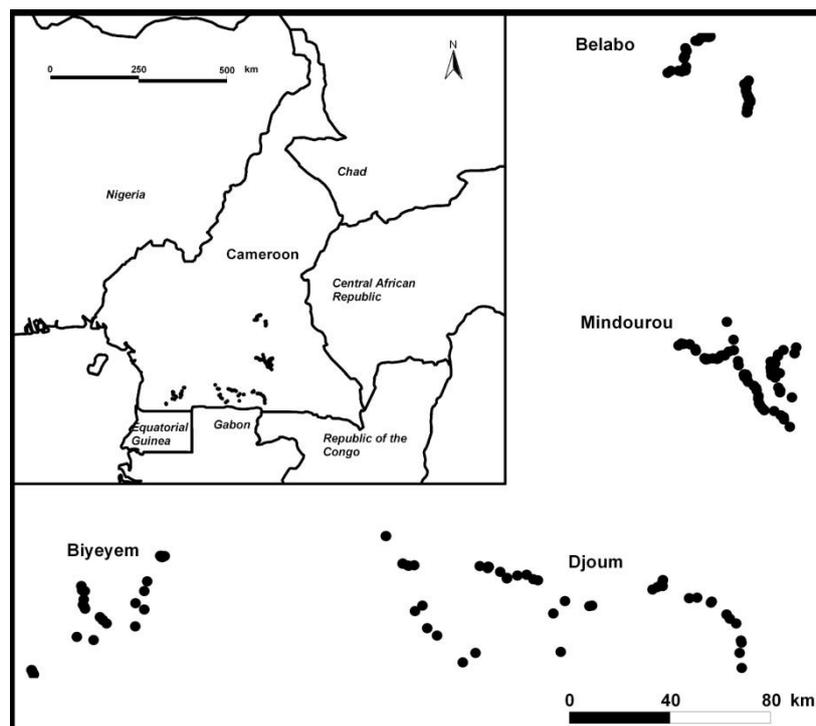


Figure 1. *Milicia excelsa* sample locations in Cameroon.

From census data and our field knowledge, we know that *M. excelsa* population density varied among populations. Population densities for reproductively mature *M. excelsa* (diameter at breast height > 35 cm; cf. chapter 7) were estimated to $D = 4.9$ trees/km² at Mindourou and 19.6 trees/km² at Djoum (Fétéké et al. 2004; FORM Ecology Consultants 2004). Our estimation takes into account current observed densities and logging rates of the last decades to obtain reliable density before exploitation. No reliable density estimates were available for Biyeyem and Belabo, but field observations suggested that they were higher than for other populations (K. Daïnou & M. Heuertz, personal observation). Populations also differed in the degree of habitat openness. Mindourou and Djoum populations are typical forest habitats with a high cover canopy. Agriculture is more pronounced in Biyeyem and includes primarily cash crops, such as coffee and cocoa, resulting in more open habitats. *Milicia excelsa* trees in this region were located and sampled in fields or fallows. The most open habitat was found in Belabo area because of forest-savanna habitat and extensive slash and burn agriculture.

6.2.3. Genotyping

DNA was extracted using the DNeasy Plant minikit (QIAGEN, Inc.). Ten specific microsatellite loci characterized by Ouinsavi et al. (2006) were tested on ten randomly selected individuals from each population. Eight loci were consistently amplified in polymerase chain reaction (PCR) and were therefore selected for genotyping. Forward primers were labelled with fluorescent dyes (between parenthesis): Mex 51 (6-FAM), Mex 63 (6-FAM), Mex 69 (Hex), Mex 81 (Hex), Mex 95 (6-FAM), Mex 137 (6-FAM), Mex 163a (Ned), Mex 202 (Ned). Loci were segregated into two PCR multiplexes as follows: (i) Mex 51, Mex 81, Mex 137, Mex 163a, Mex 202 and (ii) Mex 63, Mex 69 and Mex 95. Multiplex PCR was performed using the Multiplex PCR Kit (QIAGEN, Inc.) following the manufacturer's protocol in a final reaction volume of 10 µL (5 µL of 2x QIAGEN Multiplex Master Mix, 1 µL of primer mix, 1 µL of Q-solution, 1 µL of H₂O and 2 µL of template DNA). PCR conditions were as follows: 15-min denaturation at 95 °C followed by 30 cycles of 30-s denaturation at 94 °C, 90-s annealing at 59 °C, 60-s extension at 72 °C and 30-min final elongation at 60 °C. Amplifications were conducted using a BIOZYM PTC 200 thermocycler (Biozym Diagnostik GmbH). Genotyping was performed on an ABI PRISM 3100, using a pooled mix of 2 µL PCR product, 13 µL of deionized formamide and 0.6 µL of GS400HD size standard (Applied Biosystems).

Polymerase chain reaction fragment sizes were qualitatively scored and recorded in base pairs with two decimal place precision using GeneMapper 3.0 (Applied Biosystems). Binning into allele classes was performed with Microsoft Excel. All retained multilocus genotypes were scored for at least six of eight markers. The average of missing data per locus was 2% (Table 1).

6.2.4. Data analyses

Genetic diversity and large-scale structure. The number of alleles per locus, allelic range, the total genetic diversity (HT), the genetic diversity (HE) and the inbreeding coefficients (F_{IS}) were estimated using GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). The software Microchecker version 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) was used to detect suspected null alleles per locus and per population under the assumption of random mating. To account for suspected null alleles, genotypes at each specific locus per population were adjusted following Van Oosterhout et al. (2004), and F_{IS} was subsequently re-estimated on the transformed data. Deviations from Hardy–Weinberg genotypic expectations at each locus in each population were tested using exact tests in GENEPOP. A sequential

Bonferroni procedure was applied to discard significant deviations because of chance (Rice 1989). Differentiation among populations (F_{ST}) was estimated with SPAGeDI ver. 1.2 (Hardy & Vekemans 2002).

Homogeneity of gene pool. The presence of differentiated gene pools in the overall sample and within each population was explored using the Bayesian clustering algorithm implemented in TESS ver. 2.1 (Chen et al. 2007). This method employs a Markov chain Monte Carlo (MCMC) process to estimate allele frequencies and assign individuals probabilistically either to distinct gene pools or jointly to two or more gene pools if their genotypes indicate admixture. We used the no-admixture model with an interaction parameter w of 0.6 and a degree of trend constant (0) or linear (1). These parameters (ψ and degree of trend) affect the relative weight given to spatial position and genotype when assigning an individual to a cluster. Twenty independent analyses were carried out for each number of clusters $1 \leq K \leq 10$, using 15 000 MCMC iterations following a burn-in period of 50 000 steps. Analyses were performed for the whole data set and for each population. The number of clusters, K , that best described the data was identified using the maximum log likelihood of data [$\ln P(D | K)$], the minimum variance of [$\ln P(D | K)$] and the minimum of deviance information criterion (DIC) (Chen et al. 2007). After preliminary computations, we did 50 runs, with a burn-in number of sweeps of 10 000 and 50 000 iterations, for the best number of K . TESS software was preferred to other Bayesian clustering algorithms because it performs better in the case of continuous species distribution and low F_{ST} (Latch et al. 2006; Chen et al. 2007).

Fine-scale spatial genetic structure. We assessed SGS by spatial autocorrelation analyses within populations following Vekemans & Hardy (2004) using SPAGeDI ver. 1.2 (Hardy & Vekemans 2002). Kinship coefficients (F_{ij}) were estimated between individuals i and j using Nason's estimator (Loiselle et al. 1995). F_{ij} was regressed on the natural logarithm of the spatial distance separating individuals, $\ln(d_{ij})$, which provided regression slopes $b_{L,d}$. To test for SGS, spatial positions of individuals were permuted 10 000 times to obtain the frequency distribution of $b_{L,d}$ under the null hypothesis that F_{ij} and $\ln(d_{ij})$ were uncorrelated. The extent of SGS was quantified using the Sp -statistic (Vekemans & Hardy 2004), calculated as $-b_{L,d}40/(1 - F_1)$, where F_1 represented the mean F_{ij} for the first distance interval 0–2 km (an approximation of the mean kinship between neighbors) and the $b_{L,d,40}$ regression slope of F_{ij} on $\ln(d_{ij})$ for $d_{ij} \leq 40$ km. This distance corresponded to the maximum inter-individual distance that could be obtained in all populations. The Sp -statistic, which depends essentially on the slope of the kinship-distance curve, allows quantification and direct comparison of SGS among populations (Hardy 2003; Vekemans & Hardy 2004). To visualize SGS, kinship coefficients were also averaged over a set of distance intervals (d), giving $F(d)$, and plotted against the logarithm of geographical distance. Five distance classes were chosen to achieve the most uniform scale over populations: 0–2, 2–6, 6–18, 18–80 and >80 km.

Gene dispersal estimates. If SGS in a two-dimensional space results from IBD, gene dispersal estimates can be obtained from the $b_{L,d}$ regression slope and the kinship coefficient between neighbouring individuals (F_1) by the relationship: $N_b \equiv 4\pi D_e \sigma_g^2 = -(1 - F_N)/b_{L,d}$, where D_e is the effective population density, σ_g^2 is half the mean squared gene dispersal distance (0.71 times the quadratic average gene dispersal distance) and N_b may be interpreted as neighborhood size (Rousset 1997; Vekemans & Hardy 2004). Regression linearity is expected, if it is performed on distances ranging from σ_g to $\sigma_g/(2\mu)^{1/2}$, where μ is the mutation rate (Rousset 2000). An assumed mutation rate of 10^{-3} – 10^{-4} per generation for microsatellites translates into an upper distance limit of $\sim 20 \sigma_g$. We used an iterative approach to estimate N_b and σ_g knowing D_e , as implemented in SPAGeDI (Hardy &

Vekemans 2002). D_e was approximated as the census density D times the effective vs. census population size ratio (NeN , $D_e = D * Ne/N$) (Vekemans & Hardy 2004). The analysis may only be realized for populations with reliable census density D (Djourn and Mindourou). Demographic studies have demonstrated that Ne/N ratios in adult populations typically range from 0.1 to 0.5 (Frankham 1995). As *M. excelsa* is dioecious this ratio may be further reduced if sex ratio is unbalanced (Nunney 1993). In the Mindourou population, the sex ratio was rather one male for one female but no information was available for other populations. In addition, all individuals do not flower each year in a population (*cf.* chapter 7). To take into account these characteristics, D_e was estimated under different scenario with $D/2$, $D/4$ and $D/10$.

The relative contributions of pollen and seed dispersal can be explained by the shape of the kinship-distance curve, as Heuertz et al. (2003) showed in a simulation study using bivariate isotropic normal dispersal functions of pollen and seeds. The second derivative, k , of a third degree polynomial regression of F_{ij} on the logarithm of short distance indicates the initial kinship-distance-plot curvature (Vekemans & Hardy 2004). A concave shape ($k > 0$) at short distance indicates leptokurtic gene flow, which occurs when the short-distance component of dispersal, often seed dissemination, is spatially restricted. A convex shape ($k < 0$) at short distance indicates no such restriction.

6.3. Results

6.3.1. Genetic diversity and large-scale structure

The number of alleles per locus ranged from four to 20, resulting in values of total genetic diversity ranging from $H_T = 0.316$ to 0.853 (Table 1). Inbreeding coefficients (F_{IS}) were significantly positive for six loci out eight loci and null alleles were suspected in all populations and at eight loci, with the exception of Mex137 (Table 1). Allele frequencies were subsequently adjusted for null alleles following Van Oosterhout et al. (2004), and F_{IS} remained significantly positive for five loci (Table 1). At the population level, genetic diversity (H_E) ranged from 0.531 to 0.561 (Table 2). A significant heterozygote deficit was detected even after adjusting for null alleles, with the inbreeding coefficient ranging from $F_{IS} = 0.060$ to 0.096 (Table 2). Differentiation among populations was very low ($F_{ST} = 0.01$).

An overall analysis of the 287 individuals using TESS yielded the best clustering of the data for $K = 2$, ($[\ln P(D | K = 2)] = -5153$, DIC = 10 273) with an assignment of all individuals to one genetic cluster (estimated mixing proportions for $K = 2$: 0.98, 0.02), suggesting that the sample belongs to a single genetic unit. One genetic unit was also inferred within each population.

6.3.2. Fine-scale spatial genetic structure

The regression slope b_{Ld} of pairwise kinship coefficients on the logarithm of spatial distance was significantly negative in two populations: $b_{Ld} = -0.0063$ ($P = 0.005$) for Mindourou, and $b_{Ld} = -0.0101$ ($P = 0.003$) for Djourn (Table 2, Fig. 2). The intensity of SGS assessed at <40-km scale was $S_p = 0.0063$ (0.0016, SE) for Mindourou and $S_p = 0.0039$ (0.0051, SE) for Djourn (Table 2). In the Biyeem and Belabo populations, slopes (b_{Ld}) were not significantly different from zero (Table 2, Fig. 2).

Table 1. Characteristics of microsatellite loci for *Milicia excelsa*. N_b , number of alleles; H_T , expected heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient; F_{IS}^* , inbreeding coefficient following allele frequency adjustment according to van Oosterhout et al. (2004); f_{NA} , estimated frequencies of null alleles per locus. Overall deviation from Hardy-Weinberg genotypic proportions: * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. Within-population deviation from Hardy-Weinberg genotypic proportions: * significant at a table-wide level of $\alpha = 0.05$ after sequential Bonferroni correction.

Locus	% missing data	N_b of alleles	Size range (bp)	H_T	F_{IS}	F_{IS}^*	f_{NA}	F_{IS} / F_{IS}^*			
								Mindourou	Djoum	Biyeyem	Belabo
Mex51	0.7	5	159-171	0.316	0.365***	0.194***	0.14	0.057	0.220	0.804*/0.629*	0.723*/0.523*
Mex81	1	8	186-205	0.600	0.138***	0.052***	0.05	0.235*/0.085*	0.142	0.210/0.093	-0.016
Mex163a	1	9	204-219	0.666	0.106 ^{ns}	0.082 ^{ns}	0.02	0.108	0.177/0.060	0.116	0.047
Mex202	2.4	5	162-179	0.516	0.085***	-0.048*	0.07	-0.147	0.353*/0.120	-0.090	0.296*/0.053
Mex137	0	8	191-215	0.552	0.020 ^{ns}	nd	0.00	0.065	-0.020	0.061	-0.037
Mex69	5.2	20	175-215	0.853	0.247***	0.053*	0.09	0.615*/0.026	0.061	0.135/0.113	0.065
Mex63	1.4	8	225-250	0.552	0.242***	0.099***	0.10	0.160	0.372*/0.101	0.262/0.040	0.244*/0.076*
Mex95	4.2	4	184-203	0.386	0.342***	0.136***	0.14	0.240*/0.114	0.465*/0.263	0.374/0.175	0.374*/0.177

Table 2. Estimates of population genetics and SGS parameters for each population. N , number of individuals sampled; H_E , expected heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient; F_{IS}^* , inbreeding coefficient accounting for null alleles; F_1 , kinship coefficients between individuals separated by <2 km; b_{Ld} (b_{Ld40}), slope of the regression of kinship coefficients on the logarithm of spatial distance (between 0 and 40 km); Sp (40 km), intensity of SGS calculated for pairwise distances between individuals up to 40 km in each population; k , initial curvature of the kinship-distance curve (see text); nd, not determined; ns, not significant. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Population	N	H_E	F_{IS}	F_{IS}^*	F_1	b_{Ld}	b_{Ld40}	Sp (40 km) (SE)	k
Mindourou	104	0.553	0.184***	0.060***	0.022	-0.0063**	-0.0062**	0.0063 (0.0016)	>0
Djoum	54	0.531	0.198***	0.093***	0.035	-0.0101**	-0.0037 ^{ns}	0.0039 (0.0051)	<0
Biyeyem	51	0.545	0.192***	0.096**	0.013	-0.0014 ^{ns}	-0.0020 ^{ns}	0.0020 (0.0019)	nd
Belabo	78	0.561	0.151***	0.060***	0.014	-0.0002 ^{ns}	-0.0002 ^{ns}	0.0002 (0.0010)	nd

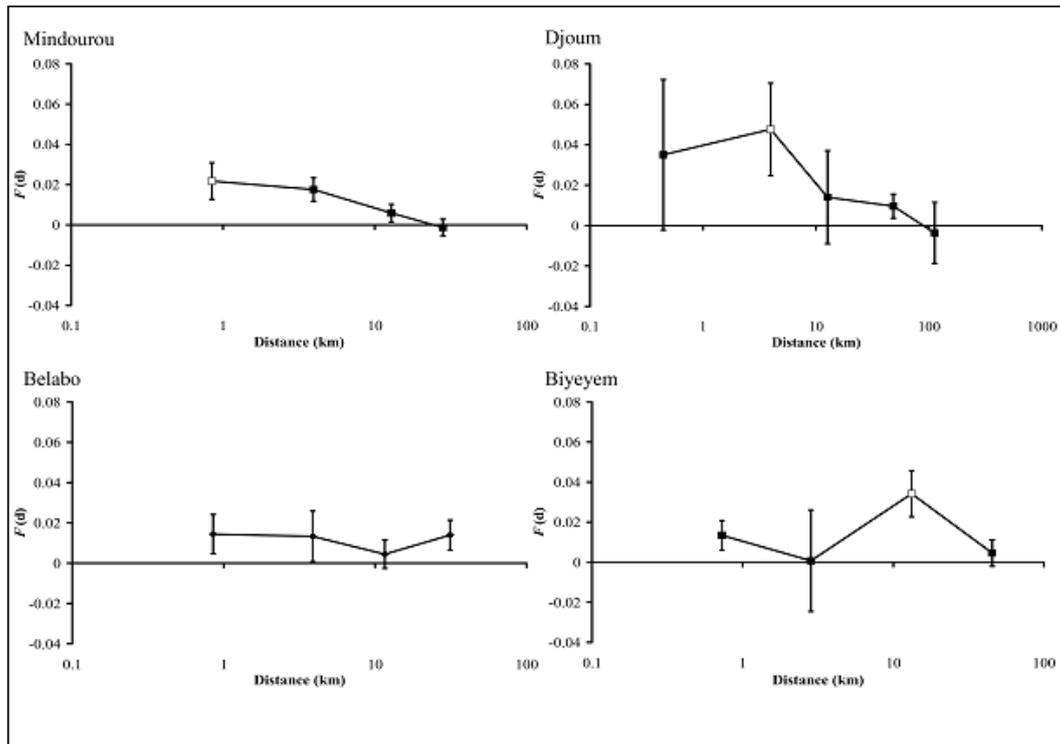


Figure 2. Average kinship-distance curves, $F(d)$, of each study population, Mindourou, Djoum, Belabo and Biyeyem. Unfilled symbols represent significant ($P < 0.05$) average kinship coefficient values and bars represent standard errors estimated by jackknife.

6.3.3. Gene dispersal estimates

Gene dispersal estimates ranged from $\sigma_g = 3.7$ to 7.1 km in Mindourou and from $\sigma_g = 1$ to 2.6 km in Djoum. These results corresponded to neighborhood sizes of $N_b = 310$ -436 trees in Mindourou and 126-303 trees in Djoum (Table 3). The initial curvature of the kinship-distance curve was concave ($k > 0$ for distances smaller than 2 km) for Mindourou, suggesting a limitation in short-range dispersal. In Djoum, such a limitation was not observed ($k < 0$, Table 2).

Table 3. Gene dispersal distance (σ_g) and neighborhood size (N_b) estimates with respective 95% confidence intervals for the Mindourou and Djoum populations using three estimates of effective densities ($D_e = D/2$, $D/4$ and $D/10$). Dispersal distances in bold represent average values for the iterative estimation method cycle (nonconvergence of the method).

Population	D_e	Trees/km ²	σ_g (km)	N_b
Mindourou	D/2	2.48	3.72 (2.12 - ∞)	432 (140 - ∞)
	D/4	1.24	5.29 (2.77 - ∞)	436 (120 - ∞)
	D/10	0.49	7.10 (4.16 - ∞)	310 (107 - ∞)
Djoum	D/2	9.80	1.01 (0.57 - ∞)	126 (40 - ∞)
	D/4	4.90	2.22 (0.82 - ∞)	303 (42 - ∞)
	D/10	1.96	2.64 (1.04 - ∞)	171 (27 - ∞)

6.4. Discussion

6.4.1. Extent and causes of SGS variation among populations

This study showed that SGS varied among populations of *Milicia excelsa*, with two populations on four exhibiting SGS and two populations exhibiting random spatial genetic arrangement of individuals.

The use of Bayesian clustering method allows the rejection of the hypothesis of admixed gene pool, and therefore demonstrates that observed SGS patterns in two populations result from IBD even in a species with high dispersal abilities and colonization dynamics. S_p -values (<0.006) in *M. excelsa* were lower than most values reported for gravity or rodent-dispersed tropical tree species, but of the same order of magnitude as those in bat- or bird-dispersed species (Hardy et al. 2006; Dick et al. 2008). Compared with S_p for wind-pollinated temperate tree species (Vekemans & Hardy 2004; Dick et al. 2008, no data on tropical are available), our values are quite similar.

Both tree density and habitat openness may affect strength of SGS in tree populations. From census data and from our field observations, we know that density of *M. excelsa* shows an increase from Mindourou and Djoum forest habitat, to field and fallow habitats of Biyeyem, and, to the open habitat of Belabo (forest-savanna mosaic). This might be because *M. excelsa* prefers increased light conditions and/or is better adapted to climates with a longer dry season such as that of Belabo (Nichols et al. 1998; Doucet 2003). SGS was significant in only the low-density populations under continuous forest cover. Stronger SGS is expected in low- compared with high-density populations because of the increase in local genetic drift at lower densities (Williams 1994; Gehring & Delph 1999; Vekemans & Hardy 2004). Alternatively, the absence of SGS in populations from high-density may well be a direct consequence of more open habitat in these populations. In contrast to the situation described for *M. excelsa*, open habitats have often been associated with low tropical tree densities, for instance, in comparisons between intact and fragmented forests (Young & Merriam 1994; Nason & Hamrick 1997; Sork et al. 2002; Jump & Penuelas 2006). However, in most studies, open habitats, even if they present lower tree density, led to an increase in gene dispersal distances, especially by pollen and irrespectively of the pollen dispersal vector (wind-pollination: El-Kassaby & Jaquish 1996; insect-pollination: White et al. 2002; Dick et al. 2003; Hanson et al. 2008; but see Jump & Penuelas 2006; Sork et al. 2002).

Human impact may also affect SGS. Current SGS patterns reflect gene flow during the last five to ten generations (e.g. Heuertz et al. 2003), which in *M. excelsa* may represent a few thousand of years. *Milicia excelsa* is one of the trees preserved for shading plantations of coffee and cacao and therefore it is unlikely that population sizes have declined because of agriculture. Logging *M. excelsa* is a fairly recent practice, initiated during the last decades that cannot yet impact SGS of adult tree.

6.4.2. Gene flow in a wind-pollinated tropical tree species

Our approach to assess gene flow from the decay of the kinship-distance curve provided indirect estimates of the extent of gene dispersal mediated by pollen and seed movements over the past few generations. Indirect methods are very useful especially for tropical tree species where direct field measurements of dispersal are often difficult to conduct (Smouse et al. 2001; Smouse & Sork 2004). Such estimates are usually not very precise and do not distinguish per se the impact of seed vs. pollen dispersal, but simulation studies and comparisons between direct and indirect estimates in different organisms indicate that they are fairly reliable (Austerlitz et al. 2004;

Vekemans & Hardy 2004; Hardy et al. 2006; Leblois et al. 2006). Estimates of gene dispersal (σ_g) ranged from 1 to 7.1 km in the two rainforest populations, depending on the assumptions of effective density (D_e). This result was one order of magnitude greater than σ_g estimates in insect-pollinated tropical trees (100-500 m, Hardy et al. 2006; Born et al. 2008). Neighborhood sizes ranged from 126 to 436 individuals, corresponding to areas of 13-633 km². Despite our density rectification, it is possible that as a result of intense logging, density estimates in *M. excelsa* may underestimate historical densities. If so, we overestimated mated dispersal distances, although it is difficult to determine to what extent. In Mindourou, for instance, iroko harvesting should be fairly recent (since 1990; R. Fétéké, personal communication). Gene dispersal probably even exceeds these estimations in the more open habitats, where our study indicated no kinship-distance correlation over distances of 40 km.

Milicia excelsa is wind-pollinated (Osmaston 1965; Joker 2002), a rare feature in tropical trees, where animal-pollination is most commonly observed (Bawa 1990; Dick et al. 2003). Wind-pollination is an inefficient pollination strategy in rainforests because of low species densities and because pollen grains are easily washed to the ground by heavy rains (Dick et al. 2008 and references therein). Paradoxically, our results suggested that under conditions of extremely low population density in rainforest populations and given the dioecious mating system in *M. excelsa*, wind-pollination may, in part, explain the large gene dispersal distances estimated in our study. Wind can carry pollen over long distances and pollen dissemination, on average, ranges farther than seed dispersal (Sato et al. 2006; Bittencourt & Sebbenn 2007; de-Lucas et al. 2008; but see Bacles et al. 2006). Wind-pollination may have independently evolved multiple times in angiosperms in response to pollinator limitation (Culley et al. 2002). In rainforest species, wind-pollination has been not only proposed for shade-tolerant trees with inconspicuous flowers, including many understory species (Bawa 1990; Bullock 1994) but has also been documented for canopy trees (Atluri et al. 2004). Even though *M. excelsa* occupies its specific niche in rainforests, it may be better adapted to semi-deciduous forests and their associated savannahs (Tondeur 1939; Nichols et al. 1998), where wind is an efficient pollen dispersal agent.

Tree species with fleshy fruits typically exhibit efficient animal-mediated seed dispersal, suggested from low among-population structure at maternally inherited markers (e.g. Raspé et al. 2000; Petit et al. 2003). The main seed disperser of *M. excelsa* in the dry semi-deciduous forest of the Afram Headwaters Forest Reserve in Ghana is the bat *Eidolon elvum* (Taylor et al. 1999). *Eidolon elvum* travels average daily distances of 29 km (Richter & Cumming 2008). High gene dispersal distances in *M. excelsa* may be explained, in part, by this fact. Congruent with putative bat-dispersal, the Djoum rainforest population from our study displayed a convex kinship-distance curve at short distances ($k < 0$), indicating the absence of any limitations to short-range gene flow. Conversely, in the Mindourou rainforest population, short-range gene flow was apparently limited ($k > 0$). This result might reflect more limited seed dispersal as a result of variation in disperser assemblages (Cordeiro & Howe 2003), which may affect dispersal distances and SGS patterns. Preliminary observations suggested that squirrels and parrots removed most seeds in this population. An alternative explanation for the difference in curvature between Djoum and Mindourou is that population density in Mindourou is substantially lower, increasing effective pollen dispersal distances because there are few nearby trees. Hence, in Mindourou population, pollen might disperse over larger distances than seeds, while in Djoum population, pollen and seeds would disperse over similar distances.

6.4.3. Management implications

Despite clear differences in SGS, overall values of genetic diversity and inbreeding coefficients were relatively homogeneous across all populations. Furthermore, genetic diversity was similar to other tropical tree species (e.g. White et al. 1999; Dutech et al. 2002; Born et al. 2008; Hanson et al. 2008). In dioecious taxa, the mating system is 100% outcrossed and inbreeding can therefore not be attributed to selfing. In populations with SGS, Mindourou and Djoum, the moderate levels of inbreeding observed might be explained by mating among relatives (biparental inbreeding). Alternatively, undetected null alleles are another possible explanation (White et al. 1999).

The observation of SGS in different populations of this threatened tropical timber tree species has direct implications for conservation and forest management. Information on SGS levels is important for seed collections to develop reforestation strategies. In comparison with panmictic populations, seed collection in populations exhibiting SGS requires greater distances among trees (here at least 10–20 km) and large sample sizes to avoid collecting seed of related trees that represent only a subset of the genetic diversity (Bittencourt & Sebbenn 2008).

A potential genetic risk for heavily exploited tree species, and particularly dioecious species, is that low pollen source diversity in a given tree becomes a limiting factor for reproductive output and/or the genetic diversity of seeds, which may further cause substantial inbreeding (Robledo-Arnuncio et al. 2004). Our indirect estimates of gene dispersal distance were extensive and suggested no major risk of inbreeding because of low population density. However, the risk that pollen may be a limiting factor cannot be assessed with our data, and the likelihood that pollen dispersal is more limited than seed dispersal should not be overlooked.

6.5. Conclusion

Patterns of genetic variation in *Milicia excelsa* in four areas of south Cameroon reveal surprisingly low levels of SGS for a species that occurs at very low densities in at least two geographical areas. Indirect estimates of gene dispersal indicated that seeds and/or pollen must disperse over several kilometers to explain this pattern. To distinguish the relative roles of seed and pollen dispersal and elucidate the contributions of dispersal agents and distances, further insights should be obtained (i) by observing seed removal in additional populations, (ii) by investigating SGS at chloroplast markers that might reveal the extent of seed dispersal, and (iii) by genotyping progeny arrays that should provide contemporary estimates of pollen dispersal distances (e.g. using TwoGener by Smouse et al. 2001; or KinDist by Robledo-Arnuncio et al. 2006).

Acknowledgements

This study is a contribution to the TROPDIV project funded by the Gembloux Agricultural University (FUSAGx, Belgium). We acknowledge the National Fund for Scientific Research of Belgium (FRS-FNRS) via grant FRFC no. 2.4576.07 and the fund Leopold III for exploration and nature conservation for financial help. We are grateful to the forest company Pallisco (particularly Michel Rougeron, Loïc Douaud and Richard Fétéké), and the NGQ Nature Plus (Belgium) for their constant effort to support our scientific studies and the fund Leopold III for exploration and nature conservation for financial help. We thank some Cameroonian botanists (especially, Théophile Ayol, Emerand Gassang, Paul Zok, Crépin N'djopande, Charlemagne

Nguembou) for their help with the sampling and Laurent Grumiau (ULB, Belgium) for his technical assistance in the laboratory. M. Heuertz is a postdoctoral researcher of FRSFNRS and acknowledges an FNRS-funded scientific visit to CIFQR-INIA.

7. Life-history traits of a tropical timber tree species: evidence of reproductive isolation and interactions between phenological and seed dispersal components (*Article 5*)

Kasso Daïnou, Eric Laurenty, Grégory Mahy, Olivier J. Hardy, Yves Brostaux, and Jean-Louis Doucet

Article en préparation.

Abstract. Very rare are interaction studies about abiotic and biotic factors with flowering processes conducted on tropical plant species, especially in Africa forests. We investigated these patterns on *Milicia excelsa*, a wind pollinated and animal seed-dispersed timber species. Based on a 6-year phenological observation and the identification of *M. excelsa* seed dispersers, the present study brought several new insights for scientists interested in the ecology of tropical tree species. We showed that initiation of flowering was caused by variation in minimum temperature and relative humidity, but also by genetic cues as (i) a stable pattern of earliness occurred over time regardless of environmental conditions, and (ii) a pattern of temporal reproductive isolation has been detected. Mean seed production per fruit decreased with flowering time, suggesting phenological selection against late bloomers. However the mean number of individuals of *Eidolon helvum* (the main seed disperser) observed per tree seemed not to be reduced along with the flowering period. Moreover *E. helvum* preferred trees in open habitats where both early and late bloomers are expected. The asynchrony persistence in the study population may be a tradeoff between phenological and seed dispersal processes.

Keywords: Central Africa, flowering initiation, flowering synchrony, *Milicia excelsa*, tropical rainforest, reproductive isolation, seed dispersal, reproductive success.

7.1. Introduction

The need is great for knowledge of environmental conditions, deterministic and stochastic processes that explain actual forest landscapes in order to model or to predict forest dynamics. Contrary to Neotropical forests (e.g., Bronstein & Hoffmann 1987; Kalko et al. 1996; Wright & Calderon 2006), reproductive ecology of plant species are rarely described enough for African forest tree species (but see Lieberman 1982; Compton et al. 1996) although these topics could inspire useful recommendations for the development of management policies (Sheil & Van Heist 2000). Description of phenological patterns in tropical tree species is one of those aspects requiring further investigations (Nyong'o et al. 1994; Singh & Kushwaha 2006).

While detailed phenological patterns in temperate tree species have revealed an interesting influence of flowering time on the reproductive success and the genetic structure of plant populations (Michaud et al. 1992; White et al. 2007), similar studies are lacking in tropical ecosystems (Hendry & Day 2005). Variations in flowering time can have important consequences on selection response and population genetic structure (Garrison et al. 2007; Hirao & Kudo 2008), sometimes leading to assortative mating and sympatric speciation (Monteiro & Furness 1998): early plants are pollinated by other early plants, and late plants by late plants (Loveless & Hamrick 1984; Elzinga et al. 2007). Several studies have confirmed a genetic control on variations of flowering time (Weis & Kossler 2004) and values of its heritability were often high: average $h^2 = 0.40$ based on 139 estimates compiled by Geber & Griffen (2003). Temporal restriction in gene flow among opposite flowering individuals is termed as "isolation by time" (IBT) by analogy with the concept of spatial reproductive isolation called "isolation by distance" (IBD) (Hendry & Day 2005). IBT can be rapid and can appear in a plant population within dozens of generations (Hendry et al. 2000; Schluter 2009). Such a temporal genetic cline can be detected in natural populations through individual-based methods: (i) correlation between the reproductive times of parents and their offspring, which also allow to infer the heritability of reproductive time; (ii) the use of genetic assignment methods and estimates of genetic differentiation between flowering groups (two-sample approach), and (iii) by plotting relatedness between individuals against their difference in reproductive time similarly to the approach used to detect IBD (Hendry & Day 2005). The first method is not suited to long-lived tree species while the second approach can detect IBT only if there is a significant differentiation between the two samples (individuals collected from different flowering times) which may be sized accordingly. The pairwise-based approach has been rarely employed (but see Hirao & Kudo 2008) as it requires thorough data on individual phenology.

When temporal reproductive isolation occurs in a plant population, adaptation and divergence are expected in some phenotypic traits due to variation of selection pressures through the reproductive period (see a brief review by Hendry & Day 2005). However we may note that the lack of such phenotypical variations does not in itself refute the existence of reproductive isolation (Hendry & Day. 2005; Hendry et al. 2007). Temporal variations of selective forces can be observed at different stages of the reproductive season: (i) flower production is commonly reduced in late bloomers (Lyons & Mully 1992; Purrington & Schmitt 1998); (ii) pollination events can vary along with the flowering period as expressed by negative correlations between seed set and reproductive times (Marquis 1988; Mahoro 2002); and (iii) during seed dispersal events: in *Tristerix corymbosis* for example, the fruiting peak corresponds to the peak in seed dispersal suggesting a reduced fitness for late

producers (Aizen 2003). For the latter, it is commonly assumed that the largest disperser assemblage is observed at fruiting peak (Howe & Smallwood 1982). However, all these patterns can affect population genetic structure only if flowering and fruiting display high heritability values. Beyond the importance of individual flowering starting, selection in flowering phenology also will depend on the synchrony between a focus plant and its neighbours (Elzinga et al. 2007; Forrest & Miller-Rushing 2010). The persistence of an important variation in blooming time may result from a trade-off between different selective pressures. For example, while early and intermediate producers may be better dispersed, off-peak or late flowering may be associated with reduced seed predation (Albrechtsen 2000; Tarayre et al. 2007) or higher seedlings survival (Purington & Schmitt 1998). Thus individual reproductive success may depend on both reproduction and regeneration patterns.

Variations of environmental factors may also contribute to flower initiation (Borchert et al. 2004). While relationships between drought conditions and leaf abscission is well accepted for seasonal tropical ecosystems (Borchert 1983; Singh & Kushwaha 2006; Forrest & Miller-Rushing 2010), a predominant role of water availability as a stressing factor of flowering initiation remained less clear or has been refuted (Bawa et al. 2003; Lobo et al. 2003; Pangou & Bouki 2011). Furthermore, determining the factors controlling flowering cycle is relevant and timely as biodiversity is facing the effects of climate change (Walther et al. 2002) and changes in phenology may be the main short-term response from vegetation (Corlett & Lafrankie 1998). Data on the proximate causes of flower induction are among the basic information needed to predict plant responses to global climate change (Singh & Kushwaha 2006; Morellato et al. 2010).

Regarding tropical timber tree species, information on reproductive characters is especially necessary as they also face significant exploitation rates. In Central African rainforests few tree species are involved in the tropical timber trade (Kouadio & Doucet 2009). Among them, *Milicia excelsa* (Welw) C.C. Berg, a near-threatened tree species according to IUCN (2010), is considered as one of the most important (ATIBT 2010). Deciduousness in *M. excelsa* was described as correlated to flowering time and to the occurrence of dry seasons (Berg 1977; Nyong'o et al. 1994). However, available data on its flowering patterns (timing, duration) are not always congruent although several authors agreed on the very short yearly reproductive period in this tree species (Berg 1977; Berg et al. 1984; Nyong'o et al. 1994; Ebert 2004; Couralet 2010). *M. excelsa* is an animal seed-dispersed tree species but it is difficult to investigate its dispersal patterns since reports pointed out the involvement of different animal species (Tondeur 1939; Aubréville 1959; Osmaston 1965; Nyong'o et al. 1994; Taylor et al. 1999).

As persistent asynchrony among flowering individuals in a single plant population should be viewed as a trade-off resulting from differential effects of life-history components, Forrest & Miller-Rushing (2010) stressed on the crucial need to combine classical phenological studies with detailed life-history characterization. To our knowledge, no investigation of floral asynchrony effects on population genetic structure has been conducted in a natural population of a tropical tree species. On the basis of phenological data collected over a 6-year period in a Cameroonian rainforest, the present study aimed at (1) describing the reproductive phenology of *Milicia excelsa* and assessing the influences of environmental and genetic cues on the timing of flowering, (2) identifying the main animal species that disperse *M. excelsa* seeds and their possible interactions with reproduction patterns.

7.2. Materials and methods

7.2.1. Study site

The study was conducted in a Cameroonian forest concession zone located at the west of the Dja Reserve and partially logged by the company Pallisco (Fig. 1). The concession extended between 3°44'-3°23'N and 13°22'-13°36'E in a mostly semi-deciduous forest zone (Kouadio & Doucet 2009). The climate is equatorial, with four seasons: two rainy periods (March to June and August to December) alternating with two dry seasons. The mean annual rainfall and temperature are, respectively, 1550 mm and 24°C (DMNC 2009). Humidity is high throughout the year. The concession zone is a low fairly flat plateau laid on a substratum of schists, gneisses and quartzite (Laclavère 1979). The mean elevation is about 650 m.

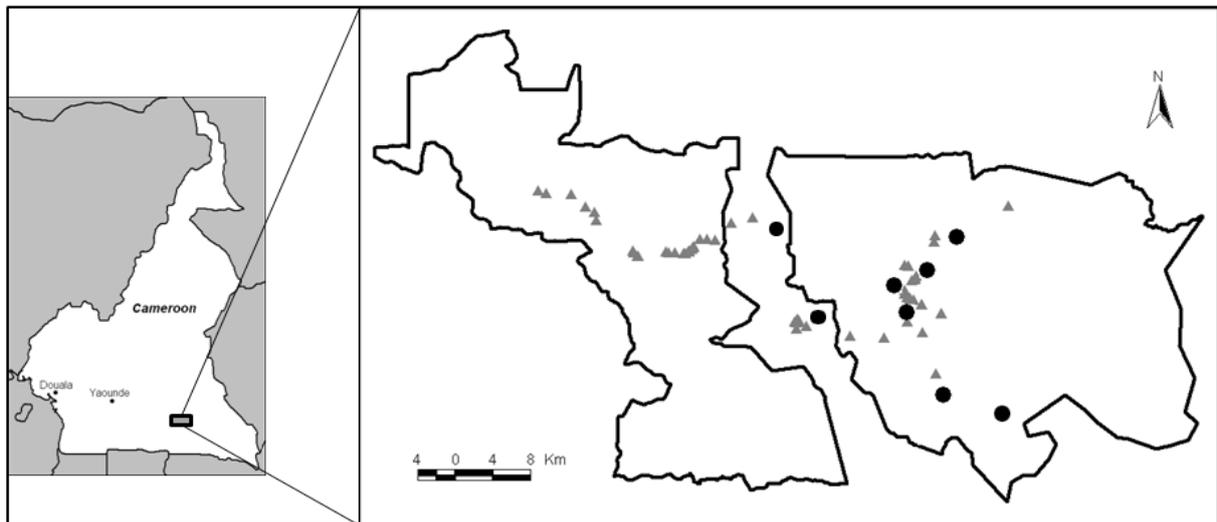


Figure 1. Position of 69 *M. excelsa* individuals sampled for the phenological study (grey triangles) and the eight trees on which frugivore observations have been conducted (black discs). The phenological sample was distributed in a Pallisco' concession (the right-side plot), another timber-production forest (the left-side plot) and farming lands (the area between the two concessions).

7.2.2. Study species and population characteristics in the study site

Milicia excelsa (Welw) C.C. Berg (*Moraceae*) is an African tree species found in a wide range of habitats from Guinea Bissau to Ethiopia and southwards to Angola and Zimbabwe. Its population density increases from the wet evergreen forest zone to the semi-deciduous forest zone or secondary forest due to its light requirements (Nichols et al. 1998). *M. excelsa* is a deciduous, large tree up to 35 m tall. It is dioecious with unclear differences between males and females regarding vegetative traits. However, when blooming occurs, flower size and toughness differ significantly according to gender. *M. excelsa* is a wind-pollinated tree species (Osmaston 1965).

In undisturbed Cameroonian rainforests, population densities of *M. excelsa* are low, especially in the study site: a mean density of 6 stems/km² was estimated for trees of diameter at breast height $dbh \geq 20$ cm (Fétéké et al. 2004). In addition the diameter frequency distribution follows a bell-shaped curve indicating a lack of regeneration (Fétéké et al. 2004). In this context, seedling establishment and development may occur almost always in logging gaps and large open areas such as crop fields and inhabited zones (Kouadio 2009).

7.2.3. Phenology study

Phenological observations were conducted over a 6-year period, from November 2004 to December 2010 on a sample of 69 trees with diameters ranging from 10 to 160 cm. The maximum distance between individuals was 12 km on the North-South axis and 22 km West-East. The tree diameters, heights and geographic coordinates were recorded. The timing, duration and intensity of (i) defoliation, (ii) flowering, (iii) presence of immature infructescences and (iv) presence of ripe infructescences were recorded once per month for each individual. As flowering time is fairly short in *M. excelsa*, the observation rate was doubled during reproduction stages, from January to April. Using binoculars and a semi-quantitative method (Morellato et al. 2000), a team of three local technicians estimated the intensity of phenophases based on percentage of the crown covered by an organ-type.

7.2.4. Genetic characterization

DNA was extracted from leaf or cambium samples from each of the 69 trees, using the DNeasy Plant minikit (QIAGEN Inc.). Seven nuclear microsatellites (Mex51, Mex63, Mex81, Mex95, Mex137, Mex163 and Mex202; Ouinsavi et al. 2006) were used for genotyping as described in Bizoux et al. (2009). Genotyping was performed on an ABI PRISM 3100 and repeated until all the multilocus individuals were scored for at least six markers. Finally, 10% of the individuals have been genotyped twice to check for possible scoring errors.

7.2.5. Fruit characteristics and frugivore observations

In 2009, a total number of 249 ripe and 412 unripe infructescences were collected from eight trees and the following parameters were measured: (i) wet mass, (ii) size via length and width, and (iii) number of mature-sized seeds. The same year, fruit-eaters on *M. excelsa* were identified from the previous eight selected trees. Crown accessibility of these focal trees was described, namely bad (*BAC*) when the crown was surrounded or dominated by other trees, moderate (*MAC*) when less than half the crown circumference was surrounded by others, good (*GAC*) when no other crown was within a 20 m radius of the focal one. Three observers conducted simultaneously direct observations to identify potential dispersers. Observations were made during immature and ripe fruit stages and covered around one month, from 24th February to 31st March, due to the different fruiting dates of the focal trees. The three observers took turns every hour and provided a total of 48-hour census sets per tree (24 hours per fruit ripeness stage) using binoculars on daylight hours and night-vision monoculars by night. For each of 105 sightings, they described and noted (i) animal species, (ii) number of visitors, (iii) times of arrival and departure, (iv) whether the animal was seen eating fruits or not, and (v) percentage of fruit cover of the focal tree. Indirect observations were also performed by using (i) infrared cameras (Stealthcam I230-IR) on two focal trees for a total of 96 hours and (ii) trapping techniques, to identify other terrestrial animal species potentially interested in *M. excelsa* fruits. For this purpose, we applied to six trees three trapping techniques namely pitfalls, mousetraps and traditional rat-traps used by local hunters, for three to four weeks per tree. To install the trapping procedure, a 50 cm high fence was put around each tree at a distance of 5 m from the trunk and six traps of each type were buried (pitfalls) or placed along or beside the fence (mousetraps and rat-traps). Mouse and rat-traps were baited with *M. excelsa* fruits, but not the pitfalls.

7.2.6. Germination rates according to date of seed collection and animal handlings

Although fecal splats were abundant under focal trees, they could not be linked to a particular frugivore as they are very similar. Therefore we only include in our data set droppings produced during sightings and only if an

unique animal species was present on the focal tree at that moment. Three categories of seeds were collected and compared: (i) 300 seeds from fresh and ripe fruits sampled underneath the focal trees (control), (ii) 237 seeds from fruits squeezed by the main frugivore (a frugivorous bat, see results) when swallowing the juicy pulp (mouth-ejected pellets), and (iii) 99 seeds from droppings (feces).

Additional ripe infructescences were also collected along within the fruiting period allowing assessing the temporal dynamics of seed germination. A total of 2,250 seeds pooled from nine trees (including the eight ones used for frugivore observations) were established in 3-5 replicates per date (16 dates) of 30 seeds each.

7.2.7. Data analysis

Climatic factors initiating flowering. We investigated the relationships between the number of individuals initiating flowering each month and the available climatic data of the study site: rainfall, relative humidity and temperature (minimum, maximum and mean). Analyses were performed with values of these parameters averaged for 1, 2 and 3 months prior to observations dates (Anderson et al. 2005). We performed a forward stepwise multiple regression to determine the most predictive climatic variables (Sparks & Carey 1995; Roberts et al. 2004). Data on daily rainfall were acquired from local weather stations while values of daily temperatures and daily relative humidity were supplied by NASA Surface meteorology and Solar Energy for the period 2004 - 2007, restricting related analyses to that period.

Flowering synchrony within years between males and females. We computed a within-year synchronization index S for each of the six years. S can be defined as the averaged proportion of trees of the two sexes which flower together at a given time, regardless the intensity or the abundance of flowers:

$$S = \sum \frac{d_j}{N_m} \quad \text{and} \quad d_j = \frac{1}{T_j} \sum_{t=1}^{T_j} f_{i(t)}$$

where i is a female and j is a male; S = synchrony index of the population; d_i = mean synchronization index for a male j with all females i in the population; $f_{i(t)}$ = proportion of females flowering with the male j at the time t ; t = flowering census number order; T_j = total number of censuses when the male j is flowering; N_m = total number of males.

Genetic influences on flowering patterns. For a given individual in a given year, the relative flowering initiation date equaled its first-census date of flowering minus the mean flowering date of all trees. Firstly we checked for a between-year synchrony at individual level using Pearson's correlation (plotting individual flowering dates between years). Regression coefficients of such correlations may indicate the strength of the heritability if we proved that the local environment may have an insignificant impact on flowering initiation (heritability should be carefully determined through controlled experiments). To detect a possible influence of intrinsic or environmental factor on flowering induction, we analyzed relationships between flowering initiation dates and (i) tree diameter, using Pearson's correlation, (ii) year \times tree status (canopy dominant vs. codominant) using two-way ANOVA, and (iii) latitudinal and longitudinal tree positions (using Pearson's correlation).

Secondly we explored whether synchrony occurs at smaller scales, checking spatial autocorrelation of the starting date of flowering of individuals through Moran's I statistic implemented in Torocor 1.0 (Hardy 2009). Moran's I values were regressed on the natural logarithm of spatial distance separating individuals, $\ln(d)$, providing regression slope $b_{\ln(d)}$. To test spatial autocorrelation, Torocor 1.0 recomputed values of I and $b_{\ln(d)}$ at a

given distance interval for 10,000 randomized data sets (i.e. permuting the position of trees) to assess their distributions under the null hypothesis of no spatial structure. To explain the pattern of spatial autocorrelation (see results), we verified whether correlation existed between pairwise genetic relatedness and (i) pairwise difference in flowering dates to detect IBT (Hendry & Dray 2005), and (ii) pairwise spatial distance to detect a pattern of isolation-by-distance or IBD (Vekemans & Hardy 2004). We first tested IBT and IBD in the whole population by performing Mantel tests (XLSTAT, Addinsoft 2012). Then, we examined those patterns at a smaller spatial scale in relation with the spatial extent found from autocorrelation analyses. Five groups characterized by individuals close to each other were formed and SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2002) was used to detect IBD and IBT considering pairs of individuals within these groups.

Characterization of seed dispersal. We first tested relationships between seed or fruit traits (length, wet mass, and number of seeds per fruit) and tree accessibility by using Pearson's statistic and we performed one way ANOVA to determine the effect of tree accessibility on the mean seed content per fruit. Then we assessed effectiveness in seed dispersal of fruit-eating animals by examining both their feeding habits and their preference regarding fruit ripeness. Characterization of fruit-ripeness preference (unripe vs. ripe) of the main fruit-eater was performed in terms of overall time spent eating *M. excelsa* fruits and number of visitors. Chi-square test was used to check fruit preference of animal species. We assumed that observations on a same tree can be considered as independent since (i) at a given time, a particular tree did not display fruit with highly different ripening stages and different trees can be at different steps in the fruit maturity process; (ii) several days separated observations on a same tree (mean and SD = 13 and 3.6 days, respectively) and there is no clear proof that highly moving animals are dependent of specific trees. To find out factors influencing the behaviour of the main disperser, we performed stepwise multiple regression analyses plotting the number of visiting animals and duration of feeding per sighting against the following predictive variables: the crown accessibility, the crown cover with fruits, the mean fruit length, the mean fruit mass (wet mass) and the mean number of seeds per fruit.

The temporal dynamics of germination rate of seeds from intact fruits and the effect of fruit handling by the main fruit-eating animal species were finally tested by germinating collected seeds. Seeds were sown on damp filter paper in sterile petri-dishes under mean temperature and relative humidity of 25°C and 60%, respectively, and were checked every 2-3 days. We performed a regression analysis by plotting germination rates against dates of collection to assess the temporal evolution of germination rates. To evaluate the influence of the main disperser on germination rates, germination censuses were pooled together for each treatment (tree-effect was not investigated as the number of seeds per treatment and per tree was low) and compared using chi-square test.

7.3. Results

7.3.1. Phenophases and demographic patterns of phenology

The tertiary sex ratio (number of adult males/number of adult females) in the study population was 0.77. The operational sex ratio (ratio of effective reproducers at a reproductive period) varied from 0.52 to 0.82 per year but was not significantly different between years ($\chi^2 = 1.70$, $df = 5$; $p = 0.888$). Both female and male trees have similar mean diameters (Student's *t*-test, $t_{53} = -0.21$, $p = 0.834$) and minimum flowering diameter was $dbh = 37$ cm, genders pooled. But only trees with $dbh \geq 65$ cm flowered at least once over the 6-year observation period. Diameter may significantly affect frequency of individual blooming: dbh was positively correlated with the

number of flowering events at individual level (Pearson's $r = 0.32$, $p = 0.011$). Among the individuals that reproduced at least once over the six years of observation, a mean of 70.6% (standard deviation SD = 17.6%) of males contributed to the annual reproduction phase while 76.3% (SD = 10.0%) of females were concerned.

Periodicity of phenophases is annual in *M. excelsa*. Leaf-fall begins at the end of the main rainy season in December and lasts 15-30 days at individual level and three months at population level (Fig. 2). Buds of leaves and flowers of males synchronously appear in February and male flowers peak at the end of that month (Fig. 3). Short-lived male flowers persist around two weeks. Female flowering presents 1-2 week delay and peaks in March. Fruit ripening occurs at the beginning of the rainy season and requires about 15 days; all infructescences ripen within 10-15 days and then eventually fall. Thus complete reproductive phenology in a given female tree has an average duration of 45 days. Only one mass fruiting year was noted in our data set, 2007, suggesting that this phenomenon may occur at a periodicity higher than 3-4 years. Although about 76% of females annually bloom, only 32.9% (SD = 10.9%) of flowering females bear ripe fruits every year (Fig. 3).

7.3.2. Flowering initiation with respect to climatic factors

The results of a stepwise regression revealed that the number of flowering individuals was significantly correlated with decrease of minimum air temperatures and relative humidity, one or three months prior to blooming (Table 1) (adjusted $r^2 = 0.58$, $p < 0.0001$). Furthermore, when performing a multiple regression analysis with those three variables alone, only the 3-months minimum temperature and relative humidity were significant (adjusted $r^2 = 0.54$, $p < 0.0001$). Rainfall seemed less important for flowering initiation.

7.3.3. Flowering synchrony and genetic influence on flowering induction

The synchrony index S ranged from 0.26 to 0.54 and there was a significant difference between the 6-year fruiting periods for individual-based synchrony (ANOVA, $F_{5,94} = 7.19$, $p < 0.0001$). At individual level, earliness or lateness in the start of blooming remained stable over time (Table 2) suggesting a genetic and/or microenvironmental determinism on flowering initiation, or an impact of the development stage of the tree (e.g. canopy-dominance status = emergent vs. dominated trees, diameter). However, there was no effect from tree status, year and their interaction on flowering initiation (two-way factorial ANOVA; $p > 0.05$ for each effect). Variations in tree diameter did not influence the first appearance of flowers (Pearson's r linking diameter to flowering dates ranged from -0.06 to -0.21 and was not significant for any year). Finally, blooming delay in any year was not significantly correlated either along a gradient of latitude (Pearson's r ranged from 0.01 to 0.21, $p > 0.05$) or following longitudinal axis (Pearson's r ranged from -0.01 to 0.12, $p > 0.05$).

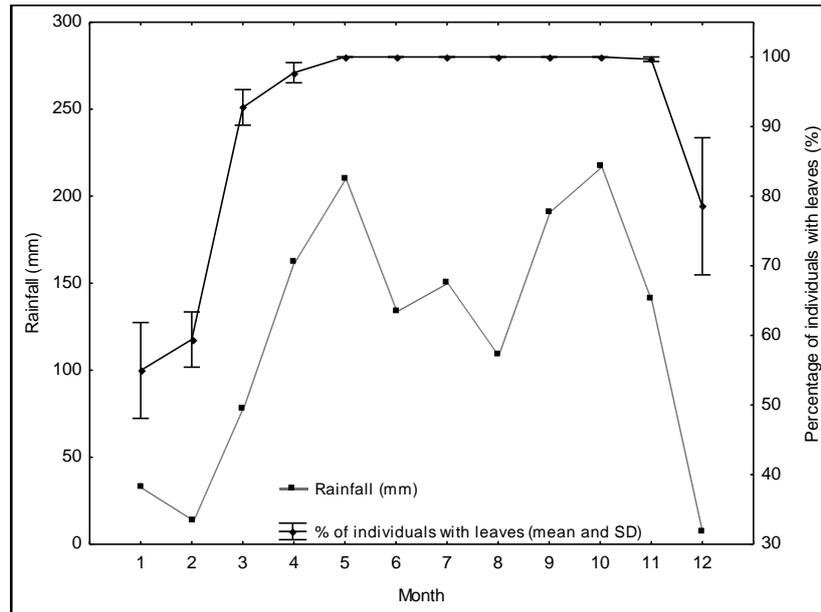


Figure 2. Rainfall and yearly leaf fall dynamics in *M. excelsa* trees.

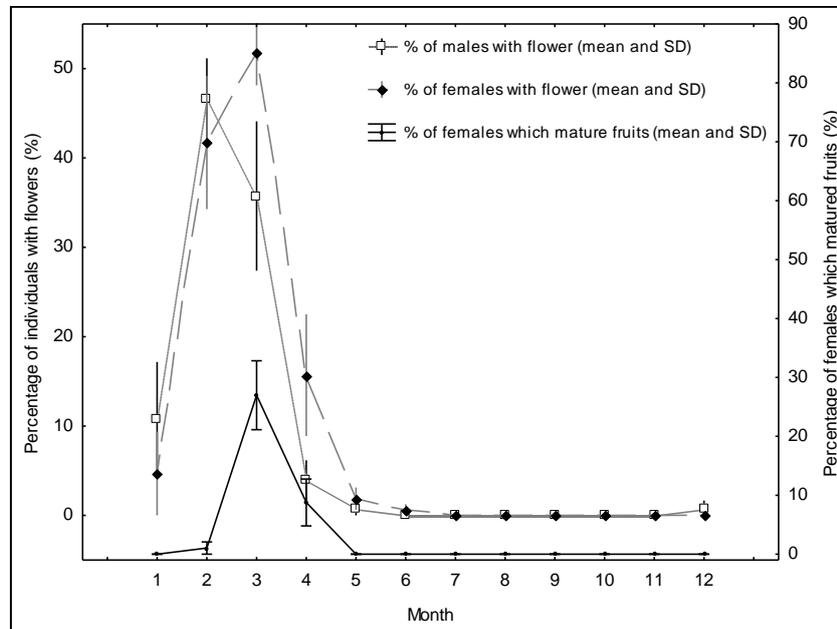


Figure 3. Percentage of males and females yearly contributing to reproduction. 1: January, 2: February, etc.

Table 1. Selected variables from the stepwise regression analysis linking flowering induction with climatic parameters. *RH-3mo* = relative humidity averaged on 3 months, *Tmn-3mo* = minimum temperature averaged on 3 months, *Tmn-1mo* = minimum temperature averaged on 1 month.

Climatic parameters	Stepwise regression coefficients	Partial correlation coefficient	<i>p</i>	Correlations <i>r</i> between variables		
				<i>RH-3mo</i>	<i>Tmn-3mo</i>	<i>Tmn-1mo</i>
<i>RH-3mo</i>	-0.576	-0.670	<0.0001		0.12	-0.08
<i>Tmn-3mo</i>	-0.552	-0.554	0.0007			0.64*
<i>Tmn-1mo</i>	0.303	0.345	0.0459			

Table 2. Pearson's r correlation coefficient obtained by plotting dates of individual flowering initiation between years. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Year	2005	2006	2007	2008	2009	2010
2005		0.83***	0.47**	0.71***	0.76***	0.74***
2006			0.68***	0.72***	0.82***	0.84***
2007				0.76***	0.66***	0.85***
2008					0.78***	0.79***
2009						0.90***
2010						

When quantifying spatial autocorrelation of individual flowering induction dates, a significant trend of flowering synchronization was detected up to a mean distance of 472.2 m for a maximum pairwise geographic distance $d_{ij} = 1,000$ m. Moran's I values were statistically significant in every year except 2007 (a mass fruiting year) and ranged from 0.37 to 0.63 with an average of 0.52 (regression slope $b_{ln(d)} = -0.04$, $p < 0.05$) (Fig. 4). Then we explored the relationship between genetic distances and variations in flowering time. At the population level, Mantel tests (basic and partial tests) revealed no relationship between genetic relatedness, differences in flowering times, and spatial distances. However, for groups of aggregated individuals separated by less than 1.7 km, results revealed a significant decrease in kinship coefficients with increase in differences of flowering initiation dates (regression slope $b = -0.002$, $p = 0.001$). Detailed analyses showed that trees with differences in flowering dates ≤ 20 days were more related than those displaying greater differences of flowering initiation dates. A genetic structure due to isolation-by-distance in these groups was not confirmed (regression slope $b_{ln(d)} = -0.015$, $p = 0.196$) but tree diameter was spatially autocorrelated until $d_{ij} = 1,000$ m (Moran's $I = 0.40$, $b_{ln(d)} = -0.09$, $p < 0.01$).

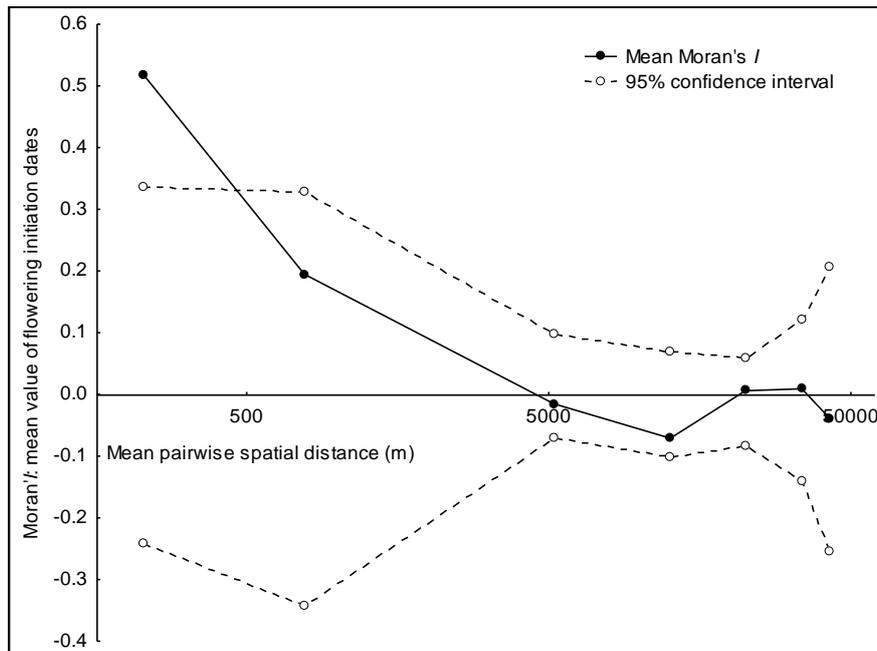


Figure 4. Regression of Moran's I values of individual-based initiation dates averaged for six years. The x axis was adjusted on a logarithmic scale.

7.3.4. Dispersers behaviour with respect to phenology and tree characteristics

Ripe fruits of *M. excelsa* are arranged in infructescences of 6.4 cm (SD = 1.3 cm) x 1.7 cm (SD = 0.4 cm), with an average weight of 12.0 g (SD = 6.5 g) and 96 seeds (SD = 105.0 seeds). The infructescences soften as they ripen and become sticky and sugary. Pairs of selected fruit traits are correlated: length and wet mass (Pearson's $r = 0.59$, $p < 0.0001$), wet mass and number of seeds (Pearson's $r = 0.54$, $p < 0.0001$), and length and number of seeds (Pearson's $r = 0.42$, $p < 0.0001$).

Crown accessibility affected the mean number of seeds per fruit (Kruskal-Wallis ANOVA; $H = 6.25$, $p = 0.043$): regardless the provenances, fruits from the *GAC* category had 217 seeds/fruit (SD = 104.1) while the related number provided by *MAC* and *BAC* trees ranged from 62.8 (SD = 38.2) to 35.9 (SD = 104.1), respectively.

Thirteen animal species comprising bats, birds and squirrels were observed feeding on the infructescences of *M. excelsa* in 2009. A total of 358 visits were unequally represented by animal species and ripening stages (Table 3). Three animals could be potentially considered as the main dispersers of *M. excelsa* seeds according to their abundance on the focal trees: the fruit bat *Eidolon helvum* and the parrot species *Psittacus erithacus* and *Agapornis swindernianus*. Among them only *E. helvum* significantly preferred ripe infructescences to unripe ones (Tables 3 and 4). Generally this fruit bat ate completely softer fruits together with a lot of seeds while harder fruits were simply pressed in its mouth to swallow the sweet juice. In contrast, parrots and squirrels chewed the fruits, which is more likely to damage the seeds. When feeding, bats consistently flew around the crown and among branches or between nearby trees whereas parrots moved less frequently. Records of dispersers ceased when the number of fruiting trees was decreasing, but *E. helvum* specimens were still well abundant on the focal trees (Fig. 5). Due to these different feeding behaviours *E. helvum* is potentially the most important disperser of *M. excelsa* seeds in terms of amount of seeds consumed and diaspores dispersed.

Six rodents were also captured in pitfalls: five shrews of *Crocidura* sp. (*Soricidae*) and an individual of *Thamnomys rutilans* (*Muridae*). However shrews are insectivorous and *T. rutilans* is too rare to be a regular consumer of *M. excelsa* fruits. Infrared cameras revealed no animal on the ground around the focal trees.

At ripening stage, the total number of sightings of *E. helvum* was 26 for all trees pooled. We assumed that the explanatory factors affecting the number of visitors per sighting were mean fruit length, crown accessibility and fruit cover. However only tree accessibility may be considered as an influencing factor (stepwise regression; adjusted $r^2 = 0.41$, $p < 0.001$). In fact the mean number of visitors per sighting was more important when trees were located in open habitats with good-accessibility crowns (ANOVA, $F_{2,23} = 9.02$, $p = 0.0013$; a *post hoc* Tukey hsd multiple comparison: $p = 0.007$ between categories *GAC* and *BAC*). One can also assume that fruit cover and fruit traits such as fruit length, wet mass and mean number of seeds per fruit may influence duration of feeding per sighting. But only fruit cover seemed to be significantly important for *E. helvum* (stepwise regression; adjusted $r^2 = 0.18$, $p = 0.0178$).

A significant decrease of number of seeds per fruit was noted in relation with flowering dates, regardless fruit provenance (Pearson's $r = -0.43$, $p < 0.0001$). However, there was no significant effect of seed collection date on germination rates (Pearson's $r = -0.03$, $p = 0.828$). Germination success was significantly associated with seed handling ($\chi^2 = 77.34$, $df = 2$, $p < 0.0001$) and was improved twofold when seeds were collected from fecal material: 93.9% vs. 46.8 and 45.3% from mouth-ejected fruits and fresh fruits, respectively.

Table 3. Visitation patterns of animal species observed feeding on *M. excelsa* fruits.

Dispersers	Number of visits			Mean time per visit (minutes)		Number of visited trees	
	Fruits at unripe stage	Fruits at ripe stage	Total	Fruits at unripe stage	Fruits at ripe stage	Fruits at unripe stage	Fruits at ripe stage
Bats							
<i>Eidolon helvum</i> Kerr 1792 (<i>Pteropodidae</i>)	22	126	148	18	22	6	7
<i>Nanonycteris</i> sp. Matschie 1899 (<i>Pteropodidae</i>)		4	4		35		2
Birds							
<i>Psittacus erithacus</i> Linné 1758 (<i>Psittacidae</i>)	23	14	37	25	4	3	3
<i>Agapornis swindernianus</i> Kuhl 1820 (<i>Psittacidae</i>)	80	41	121	5	8	3	4
<i>Hippolais polyglotta</i> Vieillot 1817 (<i>Sylviidae</i>)	19	3	22	2	6	2	1
<i>Ploceus nigerimus</i> Vieillot 1819 (<i>Ploceidae</i>)	3		3	3		1	
<i>Poicephalus gularis</i> Jardine 1849 (<i>Psittacidae</i>)	2		2	3		1	
<i>Illadopsis</i> sp. (<i>Sylviidae</i>)	2	1	3	2	2	1	1
Non identified <i>Bucconidae</i>		1	1		8		1
Squirrels							
<i>Funisciurus isabella</i> Gray 1862 (<i>Sciuridae</i>)		6	6		12		3
<i>Funisciurus pyrropus</i> F. Cuvier 1833 (<i>Sciuridae</i>)		3	3		99		2
<i>Heliosciurus gambianus</i> Ogilby 1835 (<i>Sciuridae</i>)	3	2	5	3	6	1	2
Non identified squirrel		3	3		58		1
Total	154	204	358				

Table 4. Effect of ripening stage on visitation behaviour of the three main potential dispersers. *A. swindernianus* clearly preferred unripe fruits whereas *E. helvum* was fond of ripe ones. *P. erithacus* seemed to spend more time on trees with unripe fruits.

	<i>Agapornis swindernianus</i>	<i>Psittacus erithacus</i>	<i>Eidolon helvum</i>
Effect of ripening stage on number of visitors (Chi-square test)	$\chi^2 = 12.30, df = 2$ $p < 0.0021$	$\chi^2 = 3.67, df = 2$ $p = 0.1592$	$\chi^2 = 14.19, df = 5$ $p = 0.0144$
Effect of ripening stage on time spent for all visits (Chi-square test)	$\chi^2 = 144.80, df = 2$ $p < 0.0001$	$\chi^2 = 483.34, df = 2$ $p < 0.0001$	$\chi^2 = 437.99, df = 5$ $p < 0.0001$

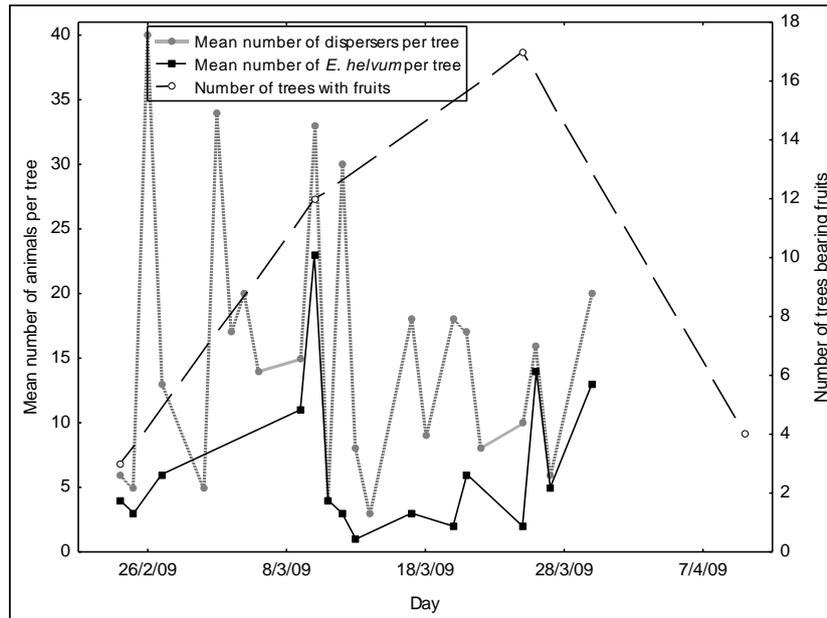


Figure 5. Disperser number dynamics during the fruiting period of *M. excelsa*. The mean number of dispersers per tree was based on a 24-hour observation period.

7.4. Discussion

The study highlighted flowering patterns in *Milicia excelsa* and the role of different animal species for its seed dispersal. While the results for phenological aspects were based on an important sample, dispersal patterns may be viewed as trends or suggestions needing further investigations, due the small sample size for frugivore observations (eight trees). There were two main reasons that have reduced our number of trees selected to identify dispersers: (i) in 2009, only 11 trees bore ripe fruits in our study population; (ii) as *M. excelsa* population density is very low in the study zone and the focal trees were well spaced out, observers displacements from a location to another were difficult. Similar constraints commonly limited tree sample sized in other studies conducted in tropical regions, ranging the number of focal individuals from one (Mishra & Gupta 2005) to nine, in most of the case (e.g., Bronstein & Hoffmann 1987; Compton et al. 1996; Taylor et al. 1999; Ratiarison & Forget 2005; Kankam & Oduro 2009). Since data on the major dispersers of specific tropical tree species are really lacking, such observations were however helpful for scientists.

7.4.1. Phenology and climatic induction of flowering

Despite yearly reproductive activity involving a large number of individuals, only a low proportion of females (about a third of yearly reproducers) bear mature infructescences in *M. excelsa* populations. Abscission in flowers and fruits is a general phenomenon in plant species and species-specific abscission has been commonly explained by pollen and resource limitation (Stephenson 1981), predators and development problems (Wiens et al. 1987). Although the psyllid gall-forming *Phytolyma* sp. causes damages to *M. excelsa* flowers and fruits, it is not considered as a predator. If seed production (total or mean values per fruit) was confirmed to be associated to earliness in blooming (just examined in 2009 in the present study), one may suspect lack of pollination or resource limitation having an influence on flower/fruit abscission.

In East Africa, Ebert (2004) observed in *M. excelsa* populations two annual flowering and fruiting episodes that correspond to the beginning of the two local rainy seasons. In the Southern Congo (Democratic Republic of the Congo) with a single dry season of 4-5 months, individuals flowered and produced fruits at the beginning (May-June) and the end (September-November) of the dry season (Couralet 2010). In the semi-deciduous forest zone of Ghana and Ivory Coast (climates with two dry seasons), blooming occurs once per year (Aubréville 1959; Nyong'o et al. 1994). Conflicting with a general view stipulating rain or drought as the main cues of flower induction (Forrest & Miller-Rushing 2010), these specific observations demonstrated that factors other than rainfall are likely to contribute to the control of flower initiation in some tropical tree species. Here, we found that minimum temperature and relative humidity may play important roles. In general, climatic cues that are cited as stressing canopy tree species, and lead to initiation of flowering and fruiting events in tropical rainforests are temperature (Ashton et al. 1988; Corlett & Lafrankie 1998; Morellato et al. 2000; Anderson et al. 2005), solar radiation (Wright & van Schaick 1994; Hamann 2004), day length (Morellato et al. 2000; Rivera et al. 2002) and sometimes relative humidity (Okullo et al. 2004). Unfortunately we did not get irradiance and day length data for the present study.

7.4.2. Temporal reproductive isolation in a *M. excelsa* population

Almeida-Neto & Lewinsohn (2004) were among the few authors who indirectly looked into genetic divergence attributable to different flowering times in a tropical plant species, *Chromolaena odorata*. They found a spatial autocorrelation pattern in flowering time and hypothesized a genetic similarity among neighbouring individuals. While recent investigations offered related information about several crop species (Cober et al. 1996; Izawa et al. 2003; Chardon et al. 2004), tree species have been studied less (Hendry & Day 2005) because their life cycle and sometimes, low population density are restrictive factors for such investigations. In all cases, these studies revealed important roles of internal signals in the regulation of flowering events and when appropriate experiments have been conducted, values of heritability of flowering time were often high (Geber & Griffen 2003).

Our study revealed a genetic influence on flowering phenology despite relative humidity and temperature may also play significant roles for flower appearance. Evidence of genetic influence came from the fact that earliness and lateness in individual flowering initiation were stable over time regardless of trunk diameter and degree of dominance in the canopy, which are proxies of the local irradiance environmental conditions. Although we suspected a high heritability for flowering time in *M. excelsa* (since regression slopes of individual blooming dates between years ranged from 0.48 to 0.65), the environmental factors should be the proximate drivers of phenology and may act as cues that set the internal 'biological clock' (e.g. Ausin et al. 2005). Edaphic characteristics also should be assessed before a conclusive view on this point. Furthermore, our results suggest a pattern of temporal-reduced gene flow due to variations of flowering times since relatedness was higher among co-flowering individuals than in the whole population. However, patterns of isolation by time (IBT) in this population was not strong and genetic differentiation among the most opposite flowering groups (considering for example two extreme groups each of ten individuals) through F_{ST} is low and not significant (results not shown). This is likely due to the low spatial extent of flowering synchrony combined with the low population density: the effective chances of mating among individuals of the same flowering group are then reduced.

7.4.3. *Opposite effects of dispersal patterns as causes of asynchrony persistence*

The concept of IBT states that within a population reproducing at different times at a particular season (even if the distributions of flowering dates are unimodal), gene flow between early and late reproducers will be limited, leading to offspring populations having reproductive times skewed towards earlier or later times (Hendry & Day 2005). Especially for plant species with short reproductive periods, some authors have argued that the persistence of phenological variation is explained by selective neutrality (Ollerton & Lack 1992). However, emerging studies revealed that selection on phenological traits can be very strong (Devaux & Lande 2009), but different biotic interactions can mitigate phenological selection (Thrall & Jarosz 1994; Elzinga et al. 2007; Forrest & Miller-Rushing 2010). In a tree species such as *Milicia excelsa* which is wind-pollinated and animal seed-dispersed, we suspect that selection may act in favor of early and intermediate flowering individuals for males because pollen dispersal by wind is likely to be more efficient during periods of leaf-shedding. Moreover, many authors noted a decrease in flower number at later flowering dates (Mazer 1987; Kelly 1993; Purrington & Schmitt 1998). In the present study, we showed that seed production per fruit is reduced at late reproductive periods in 2009, tending to confirm a relationship between earliness and seed set.

According to Forrest & Miller-Rushing (2010), genes may confer a propensity for earlier reproduction regardless environmental conditions. But the late reproducers are still present in the study population. Our results suggest that germination rates are not affected by dates of seed collection. So, for this parameter at least, both early and late flowering groups may have similar potential fitnesses. Other explanations of late bloomers persistence should come from seed dispersal patterns and seedling bank dynamics (Purrington & Schmitt 1998). *E. helvum* visited more individual trees than parrots and clearly preferred ripe fruits containing dozens of mature seeds, thereby enhancing germination rates. Moreover, as its visiting frequency was higher on trees with easily visible crowns, this fruit bat would naturally deposit *M. excelsa* diaspores in habitats suitable for seed germination and seedling growth (open-canopy forests). *E. helvum* behaviour may be an important mitigating factor against phenological selection, for the following reasons: (i) our observations tend to show that its abundance on *M. excelsa* trees did not really decrease at late flowering time, (ii) attractiveness of *E. helvum* for *M. excelsa* individuals does not seem to be affected by fruit characteristics, instead tree accessibility may be the main attractive factor, so both early and late bloomers can be favoured; (ii) this fruit bat more frequently visited trees located in open habitats, and such stems which presented significantly more seeds than those in undisturbed zones, can be of course early or late bloomers (since occurrence of canopy gaps is stochastic). Our study did not include seedling components and this aspect should require further researches.

Contrary to White & Abernethy (1996), we suggested that primates may not play a significant role in seed dispersal of *Milicia excelsa*. According to our own observations at different occasions, other animal species may contribute to seed dispersal in *M. excelsa*, as they were sometimes seen eating related fruits or simply their presence on this tree species seems to be associated with its fruiting periods: a monkey species *Cercopithecus nictitans*, three other mammal species *Galagoides demidoff* (*Galagonidae*), *Anomalurus derbianus* (*Anomaluridae*), *Perodictus potto* (*Loridae*), and one bird species *Bycanistes fistulator* (*Bucerotidae*). The fruit bat *Eidolon helvum* that we considered as the main disperser in this forest context is a voracious feeder exhibiting a rapid gut transit time (Osmaston 1965) of about 20 minutes (Richter & Walsh 2006). Therefore, it can swallow large numbers of *M. excelsa* seeds and defecate them locally around the focal trees rather than carry

them away. These feeding habits of *E. helvum* may partially explain the existence of a spatial autocorrelation in tree diameter: at a given time, most ejected seeds are likely to be deposited around parent trees or in canopy gaps. As these gaps never persist a long time in tropical rainforests, most of seedlings of the next generations should die. Thus the offspring population could mainly comprise individuals with similar diameter ranges. Alternatively, a small part of the seed set could be deposited a fair distance away from parent trees, since this bat travels an average of 29 km per night (Richter & Cumming, 2008). This may partially explain findings related to the extensive homogenous gene pool across Cameroon, Gabon, Republic of the Congo and Central African Republic in *M. excelsa* populations (Daïnou et al. 2010). But clearly the role of wind for pollen dispersal in such a tree species also should be fundamental and may require further investigations.

7.5. Conclusion

As suggested in some rainforest regions, the main climatic factors initiating flowering in canopy tree species may be others than precipitation. Although minimum temperature and relative humidity seem to play important roles for blooming induction in *Milicia excelsa*, heritability of flowering time may be high and leading to a complex interplay. Phenological synchrony is apparent in this tree population but may have a least impact due to the low population density. Our outcomes tended to show that phenological selection may favour early individuals, because the weather conditions should be suitable for pollen dispersal, and disperser assemblages should be more important during the first weeks of the reproductive period. However in this study case, fitness related to seed viability and the frugivorous fruit-bat *Eidolon helvum* also impose a tradeoff to phenological impacts.

Our findings also pointed out a series of questions that need additional investigations. Firstly, we need to better quantify fitness components in the different phenological groups in order to assess the relationships between differential flowering times and individual reproductive success. Understanding causes of flower abscission and determining the relative contribution of fruit bats in shaping population genetic structure of *M. excelsa* populations are also central questions for future consideration. It has been also suggested that a number of phenotypic traits in plants may covary with flowering times (Gérard et al. 2006). Then it would be interesting to test such hypothesis and identify different vegetative traits (e.g., leaf size; Conner & Via 1993; Andersson 1996) that correlate with flowering times, in order to predict flowering timing of individual trees.

Acknowledgements

Financial support for this research was provided by project PPR 10,000 (Gembloux Agro-Bio Tech; University of Liege) and the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS) through grants FRFC no. 2.4576.07. We greatly thank Nikki Tagg for her constructive comments and for assistance with editing the manuscript. We are indebted to the forest company Pallisco (Cameroon), the NGO Nature Plus, Dr Marc Colyn and Dr Eric Arnhem for logistic support and technical assistance. We are especially grateful to Didier Leurquin, Michel Rougeron, Loïc Douaud, Robert Haentjens, Théophile Ayol, Arnaud Biassui, Emerand Gassang, Crépin N'Djopandé, Paul Zok, Alino Ngroa, Séverin Zoa and Ismaïla Nana for their various contributions.

8. Discussion générale et perspectives

Le fil conducteur de la présente thèse est sans doute "diversité génétique". Celle-ci a été analysée d'abord au niveau du genre *Milicia*, puis à différentes échelles spatiales et en relation avec les traits d'histoire de vie de l'espèce *M. excelsa*. Il en ressort un schéma détaillé sur les événements naturels et sur les facteurs biotiques qui ont pu modéliser cette diversité au cours des millénaires passés ou qui l'affectent à l'heure actuelle. Mais, inéluctablement, des interrogations subsistent sur différents points, et une seule thèse sur ce sujet ne peut certainement pas prétendre fournir toutes les réponses aux divers aspects méconnus de l'autécologie de *M. excelsa* (la synthèse des aspects écologiques non encore maîtrisés du genre *Milicia* est présentée en chapitre 3). Le présent chapitre revient sur des résultats clés de la thèse, en abordant d'abord des questions d'ordre fondamental, puis en terminant par l'intégration éventuelle de ces résultats dans des politiques de conservation et de gestion des populations d'iroko. Les perspectives de recherche future sont écrites en gras dans les lignes suivantes.

8.1. En définitive, une ou deux espèces de *Milicia*?

Le chapitre 4 a été consacré à cette problématique, sur la base de caractères morphologiques foliaires et à partir de l'analyse de la structure génétique des populations du genre *Milicia*.

Le principal trait morphologique utilisé (la présence ou non d'alvéoles pubescentes sur la face inférieure du limbe) fait partie de ceux proposés par divers auteurs comme pouvant servir à distinguer les deux taxons (Aubréville 1959; Berg 1977; Hawthorne & Jongkind 2006). Aussi bien que la présence de poils sur les nervures, ce critère s'avère être des plus fiables car permettant de regrouper les individus en deux groupes distincts. Un autre critère paraît presque aussi pertinent, du moins en Afrique de l'Ouest: le nombre de paires de nervures secondaires N_{nerv} . Il est supposé ne jamais excéder 11 chez *M. regia* (un maximum de 10 même, selon Chevalier 1917 et Aubréville 1959), tandis qu'il dépasserait toujours 12 chez *M. excelsa*. Nos observations nous amènent à modifier légèrement cette affirmation: sur la base du seul critère précédemment énoncé, il apparaît que les irokos classés en *M. regia* peuvent avoir jusqu'à $N_{nerv} = 12$, tandis que les individus considérés comme *M. excelsa* présentaient toujours $N_{nerv} \geq 13$ en Afrique de l'Ouest. Néanmoins, ce paramètre n'est pas totalement fiable puisque quatre individus parmi les 70 classés en *M. regia* possédaient entre 13 et 15 paires de nervures secondaires (mais 3 de ces 4 individus ont été classés par TESS et STRUCTURE parmi les hybrides). Il est à noter que Berg (1977) avait déjà remarqué également que des individus de *M. regia* pouvaient présenter jusqu'à $N_{nerv} = 14$. L'utilisation de ce critère pour différencier les deux espèces en Afrique Centrale n'est évidemment pas pertinente, dans la mesure où seule *M. excelsa* serait présente dans cette région. Il importe toutefois de rappeler que plusieurs spécimens de *M. excelsa* du Cameroun présentent parfois "seulement" 12 paires de nervures (chapitre 4).

Les autres caractères proposés dans la littérature comme étant distinctifs des deux espèces se sont avérés peu fiables:

1. soit parce qu'ils étaient difficiles à apprécier, du fait d'une forte subjectivité d'appréciation: le limbe fortement vs. faiblement cordé; la couleur rouge ou jaune de la nervure principale; et la forme de la

couronne. Concernant celle-ci, et contrairement à ce qu'annonçaient Nyong'o et al. (1994), il n'est pas du tout rare qu'elle soit plus ou moins ronde chez *M. excelsa* d'après des observations faites au Cameroun;

2. soit simplement parce que ces caractères ne peuvent réellement jouer le rôle discriminant qui leur était assigné:

(i) la disposition des feuilles chez les plantules: les plantules naturelles ayant un feuillage disposé en spirale (caractéristique de *M. regia*) ne sont pas rares en Afrique Centrale où n'existe que *M. excelsa* (Doucet comm. pers.),

(ii) la longueur des infructescences. Pour ce caractère, nous ne disposions pas d'infructescences de *M. regia* mais Berg (1977) précisait que leur longueur moyenne était de 8 cm, tandis qu'elle serait comprise entre 3 et 5 cm chez *M. excelsa* (chapitre 3). Or, nos caractérisations des fruits de *M. excelsa* au Cameroun, sur une période de 5 ans, remettent en cause cette affirmation: sur 540 infructescences matures mesurées, 473 (87,6%) avaient plus de 5 cm de long et 54 (10,0%) avaient une longueur allant de 8 à 10,4 cm. En moyenne, les infructescences de *M. excelsa* ont pour dimensions 6,3 cm x 1,8 cm (résultats similaires à ceux présentés en chapitre 7 et relatifs aux mesures effectuées uniquement en 2009).

En réalité, dans le cas présent, il nous semble que les caractères morphologiques, du moins ceux relatifs aux feuilles, ne peuvent pas réellement servir à identifier des individus hybrides. Certes, les résultats du chapitre 4 tendent à montrer que la largeur relative du limbe (*l/L_limb*) pourrait jouer cette fonction, à condition qu'on puisse confirmer ultérieurement que le cluster *KI* soit composé en grande partie d'hybrides. Mais cette base d'identification morphologique d'hybrides dans le genre *Milicia* reste assez fragile, et une étude morphologique nettement étayée est recommandée... pour autant que la caractérisation morphologique des espèces soit toujours considérée comme la meilleure ou l'unique voie de délimitation des espèces. Le sujet est en effet fortement débattu depuis quelques décennies. Le doute existait déjà au 19^e siècle, Darwin (1859) résumant alors bien la situation par cette phrase: "*Nor shall I here discuss the various definitions which have been given of the term species. No one definition has as yet satisfied all naturalists; yet every naturalist knows vaguely what he means when he speaks of a species*". Jusqu'alors, les frontières entre espèces avaient toutefois pour fondement la morphologie, et bien que Darwin ait tenté d'apporter davantage de précision sur le sujet, de nombreux auteurs estiment qu'il n'a fait qu'accroître la confusion existante (Mallet 2010). D'un certain côté, Darwin semblait croire en l'existence de l'espèce comme une entité morphologique bien définie ("*I believe that species come to be tolerably well-defined objects, and do not at any one period present an inextricable chaos of varying and intermediate links*"), mais dans le même temps, il soulignait les variations parfois ténues et continues des caractères entre taxons voisins ("*in any one region and at any one time, we ought only to see a few species presenting slight modifications of structure in some degree permanent*"). La perception darwinienne de l'espèce générée par des populations morphologiquement distantes paraît un rien naïve aujourd'hui, car ne tenant pas compte de nombreuses évidences contredisant de nettes démarcations des traits interspécifiques: des individus de la même espèce et de sexes opposés peuvent présenter des différences morphologiques remarquables, les différences peuvent être prononcées entre divers stades de développement d'une espèce donnée, l'existence d'écotypes distincts d'une même espèce (Mallet 2010). Au cours des dernières décennies, ces arguments contre le concept morphologique de Darwin ont engendré l'éclosion d'une multitude de définitions de l'espèce, définitions

plus ou moins opérationnelles, et dont les subtiles différences ne sont guère toujours évidentes (Miller & Vendramin 2001; de Queiroz 2007). Mayr (1942, 1957) fut l'un des plus prolifiques biologistes contemporains ayant revisité la notion d'espèce. Des différents écrits de cet auteur, il ressort que l'espèce regroupe des populations capables de se reproduire naturellement et d'engendrer une descendance fertile, sans que la séparation morphologique interspécifique soit forcément extrêmement prononcée comme le supposait Darwin. Cette définition est demeurée de loin la plus populaire, bien que l'aspect "descendance fertile" (déjà évoqué par Darwin mais insuffisamment mis en avant alors) ne soit guère facile à tester ou à vérifier chez les arbres à maturité sexuelle tardive.

Avec le développement des outils d'analyse génétique et bien que certains biologistes estiment encore que la notion d'espèce soit un concept totalement arbitraire (Hey 2006), un nombre croissant d'auteurs ont suggéré la nécessité de combiner des informations morphologiques et phylogénétiques, mais aussi celle de comprendre l'organisation et le niveau de diversité morpho-génétique ainsi que ses causes, au sein et entre groupes (Dayrat 2005; Padial et al. 2010). De ce point de vue, la présente thèse a tenté d'apporter de nouveaux éléments de réponse, mais elle ne peut à elle seule trancher sur le nombre réel d'espèces dans le genre *Milicia*. Nous pouvons simplement suggérer que des croisements à descendance fertile sont possibles entre *M. excelsa* et *M. regia*, sur la base de l'analyse de l'ADN nucléaire. De tels croisements interspécifiques ne sont pas rares, et seraient même assez communs dans le règne végétal (Weising et al. 2005).

Les premiers résultats sur l'ADN chloroplastique évoqués en discussions du chapitre 4 tendent à confirmer nos résultats, mais devront être étayés car largement incomplètes au stade actuel. Dans le cas de l'iroko, des comparaisons morphologiques supplémentaires seront indispensables aussi bien à l'échelle de l'Afrique de l'Ouest qu'entre cette dernière et l'Afrique Centrale, afin d'approfondir les différenciations morphologiques et phylogéographiques détectées.

8.2. Histoire paléogéographique des populations de *M. excelsa*

Les résultats du présent travail tendent à ne confirmer que dans une certaine mesure l'existence de refuges forestiers en Afrique subsaharienne, bien qu'il ne nous ait pas été réellement possible de définir la localisation précise desdits refuges (chapitres 4 et 5). Les arguments importants allant dans le sens de fragmentations passées du bloc forestier sont: (i) la présence de pools géniques bien différenciés, et les plus petits de ces pools (Gabon et zone côtière de la RDC) semblent concorder aux zones supposées avoir abrité ces refuges; (ii) la répartition géographique des haplotypes du Bas Guinéen: H06 est surtout présent au Gabon tandis que le cluster Camerounais est dominé par H02 (figure 2 du chapitre 5), et (iii) la séparation entre les clusters Camerounais et Gabonais du Bas Guinéen daterait d'environ d'environ 150.000 ans BP (mais cette datation reste assez imprécise), ce qui correspond à une période de glaciation bien documentée. Par contre, d'autres résultats jettent le flou sur ce sujet: (i) les populations situées près des hypothétiques refuges forestiers n'affichent pas une diversité ou un endémisme allélique spécialement plus important que celles qui en sont éloignées; (ii) l'existence d'un pool génique centré sur le Bénin et le Nigéria, et fortement différencié des autres clusters du Bas Guinéen: ce résultat est d'autant plus interpellant qu'aucun refuge n'avait été signalé dans cette région. A noter que selon Lowe et al. (2010), la rivière Sanaga (Cameroun) bien connue comme étant une barrière physique chez les primates, semble également agir comme tel chez *Irvingia gabonensis*. Si tel était le cas chez *M. excelsa*, on

s'attendrait à une différenciation de part et d'autre de cette rivière - fait avéré par l'analyse de l'ADNcp - mais à une ressemblance entre les populations à l'ouest de cette rivière, ce qui est démenti par les résultats du chapitre 5 surtout. ***Le fleuve Niger et son delta pourraient-ils constituer une autre barrière chez l'iroko? Seule l'analyse ultérieure de populations situées de part et d'autre et au sein de ce dédale de zones humides pourrait permettre de répondre à la question.***

Certains facteurs ont pu partiellement biaiser nos résultats. En ce qui concerne la diversité génétique par exemple, rappelons qu'elle a été très probablement sous-estimée en Afrique Centrale, du fait de la présence d'allèles nuls chez les marqueurs microsatellites utilisés. Par ailleurs, le faible échantillonnage au Centre du domaine Congolais ainsi qu'en Afrique de l'Est (Ouganda, Tanzanie) ne permettait pas de définir soigneusement les limites du pool centré sur la RDC. Enfin, le modèle biologique qu'est *M. excelsa* ne constitue pas le modèle idéal pour la localisation des refuges forestiers: cette espèce considérée comme pionnière est naturellement présente aussi en lisière forêt-savane, et certains relevés polliniques tendent même à prouver qu'elle persistait remarquablement bien lors du dernier maximum glaciaire (Maley et Brenac 1998). Cela étant, Debout et al. (2010) avaient aussi conclu à un faible impact de la dernière glaciation sur la structure des populations de *Distemonanthus benthamianus*, une espèce également héliophile relativement abondante dans le bloc forestier du Bas Guinée. Chez *Erythrophleum suaveolens*, Duminil et al. (2010) n'ont pu que confirmer l'existence probable de refuges forestiers au Gabon, mais pas au Cameroun. A contrario, la tendance inverse a été rapportée chez *I. gabonensis*: Lowe et al. (2010) suggèrent pour cette espèce que les refuges n'ont dû être établis qu'au Cameroun (de part et d'autre du fleuve Sanaga), mais pas au Gabon. Pour un modèle davantage typique des forêts denses humides, *Santiria trimera* en l'occurrence, les données de Koffi (2010) sont compatibles avec les résultats attendus sous l'hypothèse des refuges situés aussi bien au Cameroun qu'au Gabon. L'existence des refuges gabonais est également suggérée par Born (2007), mais en considérant une espèce endémique de la zone, pionnière et héliophile. Que conclure de ces divers patrons et quels modèles biologiques sont les plus aptes à nous renseigner sur la théorie des refuges forestiers et leur impact sur la structure génétique des espèces végétales? La réponse la plus satisfaisante peut être tirée de l'article de Lowe et al. (2010): "Importantly, it is clear from our work that not all postulated forest refugia are of relevance to all species, as has also been observed for temperate plants". Autrement dit, chaque étude phylogéographique spécifique ne peut permettre de tirer des conclusions solides, les réponses des populations aux pressions locales des périodes glaciaires variant d'une espèce à l'autre.

8.3. Flux de gènes au sein et entre populations de *M. excelsa*

À l'échelle locale, de l'ordre de quelques dizaines de kilomètres, nos résultats ont mis en exergue l'absence ou un faible patron d'isolement par la distance (IBD) chez *M. excelsa* (chapitre 6). L'IBD n'a été détecté qu'à des échelles nettement plus conséquentes (chapitres 4 et 5). Ce résultat est parfaitement en accord avec les vecteurs de pollinisation et de dispersion des semences chez cette espèce. Il y a d'abord le vent, dont l'efficacité de dissémination est sans doute accentuée par le fait que la pollinisation a lieu en grande partie au cours de la saison sèche (période au cours de laquelle de nombreux arbres perdent leur feuillage dans ce type de forêt). D'un autre côté, les principaux agents de dispersion des diaspores d'iroko que sont les chauves-souris et les perroquets contribuent indéniablement à accroître les distances de flux géniques chez cette espèce. D'une manière générale,

les plantes dispersées par de grands disperseurs (oiseaux, chauves-souris, mammifères arboricoles, etc.) présentent des distances de dispersion génique plus importantes que celles notées chez les autres espèces (Hardy et al. 2006). Un cas notablement évocateur de ce patron résulte des travaux de Ndiade-Bourobou et al. (2010) qui ont estimé les distances de dispersion génique chez *Baillonella toxisperma* (graines dispersées surtout par l'éléphant et l'homme) entre 6 et 9 km.

Loveless & Hamrick (1984) précisent toutefois que les faibles densités de populations induisent aussi une augmentation des distances de dispersion (accroissement de la distance moyenne de dissémination pollinique), confirmant la tendance observée dans le cas de *M. excelsa* et présentée dans le chapitre 6. Il est à noter qu'il est difficile de dissocier dans le cas présent l'effet de la densité de celui de l'habitat, l'environnement le moins perturbé étant aussi celui où sont notées les densités de populations les plus faibles. Par ailleurs, autant les faibles densités provoquent de plus grandes distances de dispersion, autant - à densités similaires - l'habitat dégradé génère des distances moyennes de dispersion plus importantes (Weising et al. 2005). Chez *Dinizia excelsa* (*Fabaceae*) par exemple, Dick et al. (2003) ont noté que la distance de dissémination pollinique passait de 212 m en forêt intacte à 1.509 m en zones fortement dégradées. Des estimations de grandes distances de dissémination du pollen ont été également obtenues par Delaide (2010) pour une autre *Fabaceae*, *Distemonanthus benthamianus*. Schématiquement, la dissémination du pollen est davantage limitée en forêt fermée (< 300 m), mais aussi par la taille de l'agent disperseur: plus celui-ci est de grande taille, plus importante est la distance de pollinisation (à quelques exceptions notables près; Nason et al. 1998; Hardy et al. 2006; Dick et al. 2008). On retiendra enfin que la portée de dispersion du pollen est en général plus élevée que celle des diaspores. Lorsqu'il a pu être calculé, le ratio "distance de migration du pollen/distance de migration des graines" est toujours supérieur à 1, et ce, indépendamment de la nature du pollinisateur (Ennos 1994). Ce ratio tourne souvent autour de 2 (Weising et al. 2005; mais des écarts importants par rapport à ce chiffre ne sont pas si rares: voir Petit et al. 2005 par exemple). Ce chiffre est relativement proche de celui obtenu chez *M. excelsa* ($r = 1,76$; chapitre 5) ou encore chez *Baillonella toxisperma* ($r = 1,71$ à $2,45$; Ndiade-Bourobou et al. 2010). **Le présent travail ne peut toutefois pas fournir d'estimations probantes des distances de dispersion du pollen d'une part, et des semences d'autre part. Il s'agit là de perspectives d'études à court terme, mais qui ne pouvaient être incluses dans cette thèse.**

Pour complexifier davantage le schéma des flux géniques au sein et entre populations voisines, divers auteurs précisent que la synchronisation florale peut jouer un rôle non négligeable sur la structure génétique des populations de plantes. De sorte que l'analyse de la variabilité génétique intraspécifique requiert normalement une bonne connaissance de la phénologie de l'espèce étudiée, un fort asynchronisme floral participant à un accroissement significatif des distances moyennes de dispersion génique, ainsi que cela a été noté chez des *Ficus* par exemple (Nason et al. 1998). Non seulement la phénologie reproductive affecte les patrons de dissémination du pollen, mais elle influence aussi la nature et le comportement des disperseurs de diaspores (Dick et al. 2008), toutes choses qui ont un impact significatif sur la structure génétique des populations (Fuchs et al. 2003; Elzinga et al. 2007). Les résultats présentés dans le chapitre 7 en sont une illustration. Le synchronisme floral ne semble effectif qu'à très courte distance (≈ 1 km) et au vu de la densité locale (estimée à 2,5 arbres reproducteurs/km² dans le meilleur des cas; chapitre 6), son efficacité peut être mise en doute.

Par ailleurs, les résultats du chapitre 7 semblent indiquer également une héritabilité relativement importante de la date d'entrée en floraison, bien que des expérimentations plus rigoureuses soient nécessaires pour trancher sur la question, ou tout au moins, la comparaison des micro-environnements des individus étudiés afin de rejeter une influence abiotique éventuelle. Or, plus importante est l'héritabilité d'un trait, plus il est à craindre une différenciation génétique élevée entre groupes phénologiques "opposés" par leur temps de floraison (figure 3 du chapitre 1). Ce phénomène peut n'avoir aucune incidence sur le fitness des groupes, mais dans d'autres cas, il tend à réduire la valeur sélective d'un des groupes s'il existe une variation temporelle de l'efficacité de la pollinisation ou de la dispersion des graines (Hendry & Day 2005). En situation extrême, il peut même provoquer une spéciation sympatrique. De telles barrières reproductives dues au temps de floraison ont été largement mises en exergue chez les plantes entomophiles, lesquelles présentent souvent de longues périodes de floraison (Elzinga et al. 2007). Elles semblent un peu moins fréquentes chez les anémophiles, et encore moins lorsque la durée de floraison est particulièrement courte (Devaux & Lande 2009). Mais un tel phénomène a été noté chez *Anthoxanthum odoratum* par exemple, une graminée vivace allogame et anémophile: en moins d'un siècle, une population initiale homogène a montré des signes évidents de différenciation phénotypique remarquable (Snaydon & Davies 1976), puis, au bout de 1,5 siècle, une différenciation génétique a été notée dans la même population en relation avec l'apparition de temps de floraison divergents et sans isolement par la distance (Silvertown et al. 2005). Une évolution si rapide peut paraître surprenante, mais n'est pas très rare en réalité. Une compilation des cas scientifiquement documentés a été proposée par Hendry et al. (2007), aussi bien chez les plantes que chez les animaux, y compris les invertébrés. Dans le cas de l'iroko, on peut légitimement se demander quelle modèle évolutif serait prévisible à long terme.

Bien que nos observations personnelles nous amènent à suggérer une réduction du succès reproducteur des "late bloomers" dans le cas actuels (chapitre 7), aucun relevé ne nous permet de prouver cela. Des études ultérieures sur ce point devraient tenter de mesurer la valeur sélective des différents groupes reproducteurs d'iroko: comparaison de la production de pollen et de graines, ainsi que des taux de germination, et comparaison de l'assemblage et de l'abondance des disperseurs entre groupes d'arbres.

8.4. Intérêt des résultats pour la gestion durable des populations d'iroko

8.4.1. Intérêt pour les populations de *Milicia excelsa*

La délimitation des pools géniques de l'iroko offre un outil précieux pour la constitution éventuelle d'une banque de gènes. Un autre avantage de cette délimitation est qu'elle peut servir à établir les régions de provenances de l'iroko. Sans données sur la variabilité génétique, ces régions sont généralement établies sur des critères relatifs aux conditions environnementales (sols et climats) censées être homogènes par région de provenance (Nanson 2004). Dans une telle situation, une provenance particulière peut n'être qu'un écotype généré par une spécificité environnementale connue ou non, sans que cela soit le reflet d'une évolution réelle. Il s'ensuit un certain flou et une certaine subjectivité dans la délimitation des régions de provenances, surtout lorsque l'espèce présente une distribution large et continue (Waters 2001). La caractérisation des régions homogènes basée sur l'analyse de la structure génétique des populations peut être alors un moyen efficace de délimiter les provenances et régions de provenances (Bucci et al. 2000; Waters 2001).

Le niveau de diversité génétique des populations de *M. excelsa* a été avancé pour appuyer la mise en réserve d'une portion de la zone de forêt semi-décidue au Ghana (Ofori & Cobbinah 2007). D'une part, la mise en défens de forêts est toujours un acte louable devant être encouragé pour autant qu'il ne crée pas d'importantes tensions sociales, ou que les populations riveraines soient associées à leur gestion. D'autre part, la diversité génétique a été effectivement désignée par l'IUCN comme l'un des trois niveaux de diversité à prendre en compte pour la définition des mesures conservatoires (McNeely et al. 1990). Une controverse *a priori* légitime est entretemps apparue sur la nature de la variabilité génétique à prendre en compte: celle des locus sélectivement neutres vs. celle des locus des traits quantitatifs plus aptes à augurer des capacités évolutives des espèces, le problème étant que la corrélation entre ces deux mesures de la variabilité génétique est généralement très faible, voire nulle particulièrement pour les traits d'histoire de vie (Reed & Frankham 2001). Reed & Frankham (2003) ont toutefois prouvé en définitive qu'il existait bien une corrélation significative entre le succès reproducteur (preuve tangible de la capacité évolutive des populations) et la diversité génétique à l'échelle des populations (r moyen = 0,43 pour 34 jeux de données). Dans la mesure où la diversité génétique est elle-même liée à la taille de population, ces auteurs insistent donc sur le fait que ce dernier facteur conditionne aussi les capacités adaptatives des populations de plantes. Aucun document ne donnant toutefois des gammes de valeur-seuil pour la détection de populations en danger, la méthode la plus courante consiste à comparer la diversité génétique entre populations, ou entre organismes similaires. Sur cette base, la diversité génétique des populations de *M. excelsa* en Afrique de l'Ouest n'est nullement plus faible qu'ailleurs (chapitre 4), ou comparativement à d'autres espèces arborées tropicales qui ont été analysées aussi avec des marqueurs microsatellites (Duminil et al. 2006; Debout et al. 2010; Koffi 2010; Ndiade-Bourobou et al. 2011). Par ailleurs, bien que les écarts à la panmixie semblent marqués dans les populations d'Afrique de l'Ouest, rappelons que le calcul du F_{IS} a été sans doute biaisé par la présence d'allèles nuls pour de nombreux locus. En définitive, génétiquement parlant, aucune des populations étudiées ne manifeste un signal alarmant faisant craindre une érosion génétique rapide à moyen terme. La même conclusion s'impose pour l'Afrique Centrale où, malgré la présence sans doute accrue d'allèles nuls, les valeurs d'hétérozygotie demeurent élevées (mais favorisées aussi par le système de reproduction purement allogame chez cette espèce).

Si les densités d'iroko sont faibles en forêt fermée, elles sont bien plus importantes en milieux plus ouverts ou dégradés (Tondeur 1939; Nichols et al. 1998; chapitre 3). Ce s'explique non seulement parce que les conditions environnementales s'y prêtent mieux (les arbres en milieux ouverts produisent par exemple davantage de graines que ceux en milieux fermés; chapitre 7), mais aussi parce que *M. excelsa* est décrite comme une espèce pionnière. En tant que telles, les populations d'iroko devraient présenter une importante dynamique spatiale favorisée par les caractéristiques typiques des taxons pionniers. Si certains caractères ont bien été confirmés (production annuelle et abondante de semences dispersées par des animaux à long rayon d'action; chapitre 7), d'autres tendent à amoindrir ses aptitudes de colonisatrice, à commencer par la dioecie. Toutes choses égales par ailleurs, elle limite d'une certaine façon la production de graines par rapport à une espèce monoïque. Ainsi, à l'échelle individuelle, si le nombre moyen de graines par fruit est bien de 96 (chapitre 7), nous avons remarqué que deux arbres femelles de l'échantillon, sans doute mieux entourés d'individus mâles, produisaient annuellement entre 200 à 400 graines par fruit. Autre limite au caractère colonisateur de l'iroko: ses semences sont absentes ou rarement présentes dans la banque de graines du sol (Daïnou et al. 2011; annexe 3), malgré l'existence possible de graines dormantes (Laurenty et al. 2009). Cette dormance devrait être fort limitée dans le

temps, car nos propres tests (résultats non montrés) ainsi que ceux d'autres auteurs (Ofori 2007a) démontrent une perte importante de la viabilité au bout de quelques mois. Les chablis ou les trouées les plus propices à l'établissement naturel des plantules d'iroko sont donc celles créées autour de la période - très courte - de fructification de l'espèce, soit entre décembre et avril dans l'hémisphère nord. Autrement dit, la régénération de l'iroko en forêt naturelle n'est efficace que durant la moitié de l'année au maximum. Comparé à d'autres arbres typiquement pionniers tels que *Musanga cecropioides*, *Terminalia superba*, *Margaritaria discoidea* ou *Nauclea diderrichii*, qui, soit présentent une fructification très étalée dans l'année, soit sont présents dans la banque de graines (Hawthorne 1995), *M. excelsa* est sans doute moins bonne colonisatrice. Le maintien de son abondance actuelle en zone de forêt sempervirente ou semi-sempervirente à fort couvert végétal nécessitera certainement des interventions sylvicoles.

A court ou moyen terme, Sepulchre et al. (2008) estimaient que les populations de *M. excelsa* en Afrique Centrale ne semblent pas menacées par l'exploitation forestière. En effet, malgré une régénération moyennement favorable mais assez variable d'une sous-région à l'autre (Sepulchre et al. 2008), l'écart entre le diamètre optimal de fructification (65 cm environ selon le chapitre 7; 55 cm si l'on admet un quota suffisant de 70% de pieds fertiles) et le diamètre d'exploitation (80 cm au Gabon, 100 cm au Cameroun) n'augure pas d'une réduction importante de la densité des semenciers sous l'effet de l'exploitation. L'IUCN classe *M. excelsa* dans la catégorie "presque menacée", ce qui concrètement regroupe "*Taxa which do not qualify for Conservation Dependent, but which are close to qualifying for Vulnerable*" (IUCN 2010). Bien qu'il soit aisé de croire en la réduction passée des populations de *M. excelsa*, l'IUCN ne dispose pas de preuves de cette diminution de populations, et aucun élément de la présente thèse ne permet de confirmer la vulnérabilité supposée à moyen terme des populations de *M. excelsa* à l'échelle du continent. Toutefois, au vu de la large distribution de l'espèce, des études locales devraient être conduites afin de mieux juger de la vulnérabilité des populations de *M. excelsa*.

8.4.2. Intérêt pour les populations de *Milicia regia*

Nos résultats confirment bien que *Milicia regia* est limitée à l'Afrique de l'Ouest, entre le Sénégal et l'ouest du Ghana. Vu son absence à partir du Bénin (et probablement du Togo), il est peu probable qu'elle puisse être native aussi du Cameroun tel que décrit dans la Liste Rouge de l'IUCN. Cette distribution limitée est d'ailleurs fort surprenante et ne peut s'expliquer actuellement. L'iroko ayant fait l'objet de flux commerciaux importants en Afrique de l'Ouest par le passé, les réductions de densités de population semblent se traduire par des signaux de *bottleneck* localement (chapitre 4). On ne peut toutefois conclure à un risque d'érosion rapide de la diversité génétique, les niveaux de diversité notés en Afrique de l'Ouest étant plutôt élevés. De manière générale, les informations basiques disponibles sur l'écologie de *M. regia* sont extrêmement limitées, et la présente thèse n'ambitionnait pas et n'avait pas les moyens d'étudier en détail cette espèce. Lorsque Nichols et al. (1998) décrivent par exemple la structure diamétrique des populations d'iroko au Ghana, les résultats sont présentés pour le genre *Milicia*, les auteurs précisant que les inventaires nationaux ne distinguent pas les deux taxons. En somme, nous manquons cruellement d'informations objectives sur la dynamique et l'écologie de *M. regia* pour juger de la vulnérabilité de ses populations. Dans ce contexte, sa catégorisation en espèce "vulnérable" par l'IUCN peut paraître subjective. Cependant, elle peut être perçue comme une mesure préventive compréhensible, pour plusieurs raisons:

1. *M. regia* a une aire de distribution relativement limitée et, contrairement à de nombreuses espèces commerciales, fait l'objet d'une exploitation soutenue depuis plusieurs siècles;
2. son habitat naturel forestier fait l'objet d'importantes pressions anthropiques (zone côtière d'Afrique de l'Ouest) et il n'est pas certain que *M. regia* se développe aussi bien que *M. excelsa* en milieux ouverts;
3. la sylviculture de l'iroko est couronnée de peu de succès du fait des dégâts importants causés par l'insecte *Phytolyma lata*;
4. le bois de *M. regia* est indistinct de celui de *M. excelsa* (White 1966). Des cas de fraude peuvent donc s'observer de par la confusion entre les deux taxons. L'alerte liée à cette classification de *M. regia* par l'IUCN constitue d'une certaine façon un signal aux autorités des pays où sont présentes les deux espèces. Cela explique la protection intégrale de *M. regia* en forêts naturelles en Gambie et la nécessité de demander un permis spécial pour son exploitation dans d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest (Ghana et Côte d'Ivoire).

M. regia est clairement délaissé par les chercheurs, chose assez surprenante, surtout de la part des scientifiques du Ghana qui ont consacré de nombreux travaux à M. excelsa. Peut-on y voir une influence de considérations économiques, du fait de la plus grande abondance de ce dernier? Dans tous les cas, nous ne pouvons que souhaiter que les recherches futures soient davantage axées sur M. regia. L'écologie de cette essence, ainsi que les facteurs expliquant sa distribution actuelle sont totalement inconnus. La différenciation morphologique entre M. excelsa et M. regia devrait aussi être davantage décrite et confrontée à l'existence de formes hybrides.

Références bibliographiques

- Addinsoft 2012. XLSTAT 2012.1.01. Addinsoft, Paris, France.
- Agyeman V.K., Swaine M.D., Thompson J. 1994. Responses of tropical forest tree seedlings to irradiance and the derivation of a light response index. *J. Ecol.* **87**, 815-827.
- Aizen M.A. 2003. Influences of animal pollination and seed dispersal on winter flowering in a temperate Mistletoe. *Ecology* **84**, 2613-2627.
- Akendengué B. 1992. Medicinal plants used by the fang traditional healers in Equatorial Guinea. *J. Ethnopharmacol.* **37**, 165-173.
- Albrechtsen B.R. 2000. Flowering phenology and seed predation by a tephritid fly: escape of seeds in time and space. *Ecoscience* **7**, 433-438.
- Aldrich P.R., Hamrick J.L., Chavarriaga P., Kochert G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol. Ecol.* **7**, 933-944.
- Almeida-Neto M., Lewinsohn T.M. 2004. Small-scale spatial autocorrelation and the interpretation of relationships between phenological parameters. *J. Veg. Sci.* **15**, 561-568.
- Amarasinghe V., Carlson J.E. 2002. The development of microsatellites DNA markers for genetic analyses in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* **32**, 1904-1915.
- Amariei L. 2005. *Legal Compliance in Forestry Sector - Case Study: Cameroon. Report to FAO*. FAO, Roma.
- Anderson D.P., Nordheim E.V., Moermond T.C., Gone Bi Z.B., Boesch C. 2005. Factors influencing tree phenology in Taï National Park, Côte d'Ivoire. *Biotropica* **37**, 631-640.
- Andersson S. 1996. Floral variation in *Saxifraga granulata*: phenotypic selection, quantitative genetics and predicted response to selection. *Heredity* **77**, 217-223.
- Anhuf D., Ledru M-P., Behling H. et al. 2006. Paleo-environmental change in Amazonian and African rainforest during the LGM. *Palaeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **239**, 510-527.
- Ashton P.S., Givnish T.J., Appanah S. 1988. Staggered flowering in the Dipterocarpaceae: new insights into floral induction and the evolution of mast fruiting in the seasonal tropics. *Am. Nat.* **132**, 347-370.
- ATIBT 1986. *Atlas des bois tropicaux. Tome 1 - Afrique*. ATIBT, Paris.
- ATIBT 2010. Statistiques 2009. *La lettre de l'ATIBT* **32**, 4-25.
- Atluri J.B., Venkata Ramana S.P., Subba Reddi C. 2004. Explosive pollen release, wind-pollination and mixed mating in the tropical tree *Shorea robusta* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae). *Curr. Sci.* **86**, 416-419.
- Aubréville A. 1959. *La Flore forestière de la Côte d'Ivoire. Deuxième édition révisée - Tome 1*. CTFT, Nogent-sur-Marne, Seine, France.
- Aubréville A. 1962. Savanisation tropicale et glaciations quaternaires. *Adansonia* **2**, 16-84.
- Ausin I., Alonso-Blanco C., Mertinez-Zapater J-G. 2005. Environmental regulation of flowering. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 689-705.
- Austerlitz F., Dick C.W., Dutech C. et al. 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Mol. Ecol.* **13**, 937-954.

- Azonkponon N. 2001. *Conservation in situ de l'iroko (Milicia excelsa (Welw.) C.C. Berg) dans l'aire culturelle vodun du Bénin*. Mémoire de DESS, UAC, Bénin.
- Bacles C.F.E., Lowe A.J., Ennos R.A. 2006. Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science* **311**, 628.
- Baldwin B.G., Markos S. 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of Calycadenia (Compositae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **10**, 449-463.
- Barilani M., Bernard-Laurent A., Mucci N. et al. 2007. Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. Graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. *Biol. Conserv.* **137**, 57-69.
- Bawa K.S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **21**, 399-422.
- Bawa K.S., Kang H., Grayum M.H. 2003. Relationships among time, frequency, and duration of flowering in tropical rain forest trees. *Am. J. Bot.* **90**, 877-887.
- Bearhop S., Fiedler W., Furness R.W. et al. 2005. Assortative mating as a mechanism for rapid evolution of a migratory divide. *Science* **310**, 502-504.
- Beaumont M.A. 2008. Joint determination of topology, divergence time, and immigration in population trees. In: Matsura S., Forster P., Renfrew C., eds. *Simulations, Genetics and Human Prehistory*. McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge, 135-154.
- Beheregaray L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* **17**, 3754-3774.
- Bennett K.D., Tzedakis P.C., Willis K.J. 1991. Quaternary refugia of north European trees. *J. Biogeogr.* **18**, 103-115.
- Benthham G., Hooker J.D. 1880. Urticaceae. *Genera Plantarum* **3**, 341-395.
- Berg C.C. 1977. Revisions of African Moraceae (excl. *Dorstenia*, *Ficus*, *Musanga*, *Myrianthus*). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **47**, 267-407.
- Berg C.C. 1982. The reinstatement of the genus *Milicia* Sim (Moraceae). *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* **52**, 225-229.
- Berg C.C. Hijman M.E.E., Weerdenburg J.C.A. 1984. *Flore du Gabon n°26 - Moracées*. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.
- Biraud J. 1959. Reconstitution naturelle et amélioration des peuplements d'okoumé au Gabon. *Bois et Forêts des Tropiques* **66**, 3-28.
- Bittencourt J.V.M., Sebbenn A.M. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* **99**, 580-591.
- Bittencourt J.V.M., Sebbenn A.M. 2008. Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TwoGener analysis. *Conserv. Genet.* **9**, 855-868.
- Bizoux J-P., Daïnou K., Bourland N. et al. 2009. Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low density wind pollinated tropical tree. *Mol. Ecol.* **18**, 4398-4408.
- Bonn A., Storch D., Gaston K.J. 2004. Structure of the species-energy relationship. *Proc. R. Soc. Lond. B* **271**, 1685-1691.
- Bonnefille R. 2007. Rainforest responses to past climate changes in tropical Africa. In: Bush M.B., Flenley J.R., eds. *Tropical rainforest responses to climate change*. Praxis Publishing, Chichester, 117-170.

- Borchert R. 1983. Phenology and control of flowering in tropical trees. *Biotropica* **15**, 81-89.
- Borchert R., Meyer S., Felger R.S., Porter-Bolland L. 2004. Environmental control of flowering periodicity in Costa Rican and Mexican tropical dry forests. *Global Ecol. Biogeogr.* **13**, 409-425.
- Born C. 2007. *Diversité génétique et dynamique des forêts d'Afrique centrale: une étude multi-échelle de la structure de la diversité génétique d'un arbre pionnier *Aucoumea klaineana**. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II (France).
- Born C., Hardy O.J., Chevallier M.H. et al. 2008. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. *Mol. Ecol.* **17**, 2041–2050.
- Born C., Vignes H., Muloko N., Wickings E.J., Hossaert-Mickey M., Chevallier M.H. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Aucoumea klaineana* Pierre (Burseraceae), a tropical rainforest tree of Central Africa. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 1054-1056.
- Bosu P., Cobbinah J.R., Nichols J.D., Nkrumah E.E., Wagner M.R. 2006. Survival and growth of mixed plantations of *Milicia excelsa* and *Terminalia superba* 9 years after planting in Ghana. *Forest Ecol. Manag.* **233**, 352-357.
- Brncic T.M., Willis K.J., Harris D.J., Washington R. 2006. Culture or climate? The relative influences of past processes on the composition of the lowland Congo rainforest. *Philos. T. Roy. Soc. B* **362**, 229-242.
- Brondani R.P.V., Gaiotto F.A., Missiaggia A.A., Kirst M., Gribel R., Grattapaglia D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) an endangered tree species of the Amazon forest. *Mol. Ecol. Notes* **3**, 177-179.
- Bronstein J.L., Hoffmann K. 1987. Spatial and temporal variation in frugivory at a neotropical fig, *Ficus pertusa*. *OIKOS* **49**, 261-268.
- Bucci G., Vendramin G.G. 2000. Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Mol. Ecol.* **9**, 923-934.
- Bullock S.H. 1994. Wind pollination of neotropical dioecious trees. *Biotropica* **26**, 172-179.
- Burczyk J., Koralewski T.E. 2005. Parentage versus two-generation analyses for estimating pollen-mediated gene flow in plant populations. *Mol. Ecol.* **14**, 2525-2537.
- Bureau E. 1873. Moraceae. In: De Candolle A., eds. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Sumptibus Sociorum Treuttel et Würtz, Paris, France, 211-279.
- Capuron R. 1968. *Vingt fiches botaniques d'essences forestières de Madagascar*. CTFT, Paris, France.
- Cardi C., Vaillant A., Sanou H., Kelly B.A., Bouvet J-M. 2005. Characterization of microsatellites markers in the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F Gaertn) in Mali. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 524-526.
- Carrière S.M. 2002. L'abattage sélectif: une pratique agricole ancestrale au service de la régénération forestière. *Bois et Forêts des Tropiques* **272**, 45-62.
- Cato S.A., Richardson T.E. 1996. Inter- and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* D Don. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 587-592.
- Cavers S., Navarro C., Lowe A.J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Mol. Ecol.* **12**, 1451-1460.

- Chapuis M-P., Lecoq M., Michalakis Y. et al. 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Mol. Ecol.* **17**, 3640-3653.
- Chardon F., Virlon B., Moreau L. et al. 2004. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* **168**, 2169-2185.
- Chen C., Durand E., Forbes F., François O. 2007. Bayesian clustering algorithmes ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Mol. Ecol.* **7**, 747-756.
- Cheng Y.J., Meng H.J., Guo W.W., Deng X.X. 2006. Universal chloroplast primer pairs for simple sequence repeat analysis in diverse genera of fruit crops. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **81**, 132-138.
- Chesson P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **31**, 343-358.
- Chevalier A. 1912. Novitates florae africanae - Urticaceae. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **58/8d**, 207-211.
- Chevalier A. 1917. *Les végétaux utiles d'Afrique tropicale française - La forêt et les bois du Gabon*. Challamel, Paris.
- Chung S., Staub J.E. 2003. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theor. Appl. Genet.* **107**, 757-767.
- Chybicki I.J., Burczyk J. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *J. Heredity* **100**, 106-113.
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**, 1657-1659.
- Cober E.R., Tanner J.W., Voldeng H.D. 1996. Genetic control of photoperiod response in early-maturing, near-isogenic soybean lines. *Crop Sci.* **36**, 601-605.
- Colinvaux P.A., de Oliveira P.E., Moreno J.E., Miller M.C., Bush M.B. 1996. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science* **274**, 85-87.
- Colinvaux P.A., Irion G., Räsänen M.E., Bush M.B. 2001. A paradigm to be discarded: geological and paleoecological data falsify the Haffer&Prance refuge hypothesis of Amazonian speciation. *Amazoniana* **16**, 609-646.
- Collevatti R.G., Grattapaglia D., Hay J.D. 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Mol. Ecol.* **12**, 105-115.
- Colyn M., Gautier-Hion A., Verheyen W. 1991. A re-appraisal of paleoenvironmental history in Central Africa: evidence for a major fluvial refuge in the Zaire basin. *J. Biogeogr.* **18**, 403-407.
- Compton S.G., Craig A.J.F.K., Waters I.W.R. 1996. Seed dispersal in an African fig tree: birds as high quantity, low quality dispersers? *J. Biogeogr.* **23**, 553-563.
- Conner J., Via S. 1993. Patterns of phenotypic and genetic correlations among morphological and life-history traits in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Evolution* **47**, 704-711.
- Cordeiro N.J., Howe H.F. 2003. Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. *P. Natl Acad. Sci. USA.* **100**, 14052-14056.

- Corlett R.T., Lafrankie J.R. 1998. Potential impacts of climate change on tropical Asian forests through an influence on phenology. *Clim. Change*. **39**, 439-453.
- Cornuet J.M., Luikart G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Couralet C. 2010. *Community dynamics, phenology and growth of tropical trees in the rain forest Reserve of Luki, Democratic Republic of Congo*. PhD thesis, University of Gent (Belgium).
- Craft K.J., Ashley M.V., Koenig W.D. 2002. Limited hybridization between *Quercus lobata* and *Quercus douglasii* (Fagaceae) in a mixed stand in central coastal California. *Am. J. Bot.* **89**, 1792-1798.
- Culley T.M., Wellerand S.G., Sakai A.K. 2002. The evolution of wind pollination in angiosperms. *Trends Ecol. Evol.* **17**, 361 - 369.
- Daïnou K., Bauduin A., Bourland N., Gillet J-F., Fétéké F., Doucet J-L. 2011. Soil seed bank characteristics in Cameroonian rainforests and implications for post-logging forest recovery. *Ecol. Eng.* **37**, 1499-1506.
- Daïnou K., Bizoux J.-P., Doucet J.-L., Mahy G., Hardy O.J., Heuertz M. 2010. Forest refugia revisited: nSSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae). *Mol. Ecol.* **19**, 4462-4477.
- Dalling J.W., Brown T.A. 2009. Long-term persistence of pioneer species in tropical rain forest soil seed banks. *Am. Nat.* **173**, 531-535.
- Damette O., Delacote P. 2011. Unsustainable timber harvesting, deforestation and the role of certification. *Ecol. Econ.* **70**, 1211-1219.
- Darwin C.R. 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- Dauby G., Duminiel J., Heuertz M., Hardy O.J. 2010. Chloroplast DNA polymorphism and phylogeography of a Central African tree species widespread in mature rainforests: *Greenwayodendron suaveolens* (Annonaceae). *Trop. Plant Biol.* **3**, 4-13.
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* **85**, 407-415.
- de Freitas J.V., Pinard M.A. 2008. Applying ecological knowledge to decisions about seed tree retention in selective logging in tropical forests. *Forest Ecol. Manag.* **256**, 1434-1442.
- de Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* **56**(6), 879-886.
- Debout G.D.G., Doucet J-L., Hardy O.J. 2010. Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae). *Heredity* **104**, 1-12.
- DeFrees S., Wilson D. 1988. *Eidolon helvum*. *Mammalian Species* **312**, 1-5.
- Degen B., Bandou E., Caron H. 2004. Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity* **93**, 585-591.
- Delaide B. 2010. *Etude de la dispersion des graines et du pollen d'un arbre des forêts denses africaines à faible régénération: le movingui (Distemonanthus benthamianus)*. Mémoire de fin d'études, ULB, Belgique.
- Delègue M-A., Fuhr M., Schwartz D., Mariotti A., Nasi R. 2001. Recent origin of a large part of the forest cover in the Gabon coastal area based on stable carbon isotope data. *Oecologia* **129**, 106-113.

- de-Lucas A.I., Robledo-Arnuncio J.J., Hidalgo E., Gonzalez-Martinez S.C. 2008. Mating system and pollen gene flow in Mediterranean maritime pine. *Heredity* **100**, 390-399.
- Demesure B., Comps B., Petit R.J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* **50**, 2515-2520.
- Denslow J.S. 1987. Tropical rainforest gaps and tree species diversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 431-451.
- Devaux C., Lande R. 2009. Selection on variance in flowering time within and among individuals. *Evolution* **64**, 1311-1320.
- Dick C.W., Etchelecu G., Austerlitz F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Mol. Ecol.* **12**, 753-764.
- Dick C.W., Hardy O.J., Jones F.A., Petit R.J. 2008. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Trop. Plant Biol.* **1**, 20-33.
- Dick C.W., Heuertz M. 2008. The complex biogeography of a widespread tropical tree species. *Evolution* **62**, 2760-2774.
- DMNC 2009. *Température et pluviométrie mensuelles relevées à Lomié, de 1979 à 2008*. DMNC, Douala (Cameroon).
- Dobzhansky T. 1950. Evolution in the tropics. *Am. Sci.* **38**, 209-221.
- Doligez A., Baril C., Joly H.I. 1998. Fine-scale spatial genetic structure with nonuniform distribution of individuals. *Genetics* **148**, 905-919.
- Doucet J-L. 2003. *L'alliance délicate de la gestion forestière et de la biodiversité dans les forêts du Centre du Gabon*. Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques – Gembloux (Belgique).
- Dow B.D. 1995. *Characterization of mating system of bur oak (Quercus macrocarpa) using microsatellite DNA markers*. PhD thesis, University of Illinois – Chicago (U.S.A.).
- Drabkova L., Kirschner J., Vlcek C. 2002. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Mol. Biol. Rep.* **20**, 161-175.
- Droissart V. 2009. *Etude taxonomique et biogéographique des plantes endémiques d'Afrique centrale atlantique: le cas des Orchidaceae*. Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles (Belgique).
- Duguma B., Tonye J., Kanmegne J., Manga T., Enoch T. 1994. Growth of ten multipurpose tree species on acid soils in Sangmelima, Cameroon. *Agrofor. Syst.* **27**, 107-119.
- Duminil J., Caron H., Scotti I., Cazal S-O., Petit R.J. 2006. Blind population genetics survey of tropical rainforest trees. *Mol. Ecol.* **15**, 3505-3513.
- Duminil J., Di Michele M. 2009. Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosyst.* **143**, 528-542.
- Duminil J., Fineschi S., Hampe A. et al. 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *Am. Nat.* **169**, 662-672.
- Duminil J., Heuertz M., Doucet J-L. et al. 2010. CpDNA-based species identification and phylogeography: application to African tropical tree species. *Mol. Ecol.* **19**, 5469-5483.
- Dumolin-Lapegue S., Demesure B., Fineschi S., LeCorre V., Petit R.J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* **146**, 1475-1487.

- Dupuy B., Mille G. 1991. *Les plantations à vocation de bois d'œuvre en Afrique intertropicale humide*. FAO, Rome.
- Durrieu de Madron L. 2003. Accroissement diamétrique du bété et de l'iroko. *Bois et Forêts des Tropiques* **275**, 85-87.
- Dutech C., Seiter J., Petronelli P., Joly H.I., Jarne P. 2002. Evidence of low gene flow in a neotropical clustered tree species in two rainforest stands of French Guiana. *Mol. Ecol.* **11**, 725-738.
- Duveiller G., Defourny P., Desclée B., Mayaux P. 2008. Deforestation in Central Africa: estimates at regional, national and landscape levels by advanced processing of systematically distributed Landsat extracts. *Remote Sens. Environ.* **112**(5), 1969-1981.
- Ebert S.J. 2004. *Silvicultural potential of Milicia excelsa*. I-TOO Working Paper n°18, Freiburg (Germany).
- Edwards C.E., Soltis D.E., Soltis P.S. 2008. Using patterns of genetic structure based on microsatellite loci to test hypotheses of current hybridization, ancient hybridization and incomplete lineage sorting in *Conradina* (Lamiaceae). *Mol. Ecol.* **17** (23), 5157-5174.
- Elenga H., Maley J., Vincens A., Farrera I. 2004. Palaeoenvironments, palaeoclimates and landscape development in Atlantic Equatorial Africa: a review of key sites covering the last 25 kyrs. In: Battarbee W., Gasse F., Stickley C.E., eds. *Past climate variability through Europe and Africa*. Springer-Verlag, Dordrecht, The Netherlands, 181-198.
- El-Kassaby Y.A., Jaquish B. 1996. Population density and mating pattern in western larch. *J. Heredity* **87**, 438-443.
- Elzinga J.A., Atlan A., Biere A., Gigord L., Weis A.E., Bernasconi G. 2007. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 432-439.
- Endler J.A. 1977. *Geographic variation, speciation, and clines*. Princeton University Press, Surrey, UK.
- Engler G.H.A. 1894. Moraceae africanae 1. *Bot. Jahrb.* **20**, 139-150.
- Ennos R.A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* **72**, 250-259.
- Epperson B.K. 2000. Spatial genetic structure and non-equilibrium demographics within plant populations. *Plant Species Biol.* **15**, 269-279.
- Erkens R.H.J., Cross H., Maas J.W., Hoenselaar K., Chatrou L.W. 2008. Assessment of age and greenness of herbarium specimens as predictors for successful extraction and amplification of DNA. *Blumea* **53**(2), 407-428.
- Evrard C. 1968. *Recherches écologiques sur le peuplement forestier des sols hydromorphes de la Cuvette centrale congolaise*. I.N.E.A.C., Série scientifique n° 110, Bruxelles.
- FAO 1986. *Some medicinal forest plants of Africa and Latin America*. FAO, Rome.
- FAO 2008. *Les forêts et l'énergie: questions principales*. FAO, Rome.
- FAO 2011. *Situation des forêts du monde 2011*. FAO, Rome.
- Fétéké R., Nkolong E., Hubert D. 2004. *Plan d'aménagement des unités forestières d'aménagement n° 10041, 10042 et 10044 regroupées*. Pallisco, Douala, Cameroun.

- Field D.L., Ayre D.J., Whelan R.J. 2009. Molecular and morphological evidence of natural interspecific hybridization between the uncommon *Eucalyptus aggregata* and the widespread *E. rubida* and *E. viminalis*. *Conserv. Genet.* **10**, 881-896.
- Fischer A.G. 1960. Latitudinal variations in organic diversity. *Evolution* **14**, 231-236.
- Fjeldså J., Lovett J.C. 1997. Geographical patterns of old and young species in African forest biota: the significance of specific montane areas as evolutionary centres. *Biodivers. Conserv.* **6**, 325-346.
- FORM Ecology Consultants 2004. *Plan d'aménagement durable UFA 09-021*. Wijma S.A., Douala, Cameroun.
- Forrest J., Miller-Rushing A.J. 2010. Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**, 3101-3112.
- Forsyth T. 2005. The political ecology of the ecosystem approach for forests. In: Sayer J.A., Maginnis S., eds. *Forests in landscapes: ecosystem approaches to sustainability*. IUCN, Cambridge, 165-175.
- Frankham R. 1995. Effective population size adult population size ratios in wildlife - a review. *Genet. Res.* **66**, 95-107.
- Frankham R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* **126**, 131-140.
- Freitas L., Bolmgren K. 2008. Synchrony is more than overlap: measuring phenological synchronization considering time length and intensity. *Rev. Bras. Bot.* **31**, 721-724.
- Fuchs E.J., Lobo J.A., Quesada M. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Conserv. Biol.* **17**(1), 149-157.
- Gapare W.J., Aitken S.N. 2005. Strong spatial genetic structure in peripheral but not core populations of Sitka spruce *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. *Mol. Ecol.* **14**, 2659-2667.
- Garcia F., Noyer J-L., Risterucci A-M., Chevallier M-H. 2004. Genotyping of mature trees of *Entandrophragma cylindricum* with microsatellites. *J. Heredity* **95**, 454-457.
- Garrison B.A., Koenig W.D., Knops J.M.H. 2007. Spatial synchrony and temporal patterns in acorn production of California black oaks. In: Merenlender A., McCreary D., Purcell K.L., eds. *Proceedings of the symposium on oak woodlands*. Department of Agriculture, Washington DC, USA, 343 -356.
- Gaston K.J. 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* **405**, 220-227.
- Geber M.A., Griffen L.R. 2003. Inheritance and natural selection on functional traits. *Int. J. Plant Sci.* **164**, S21-S42.
- Gehring J.L., Delph L.F. 1999. Fine-scale genetic structure and clinal variation in *Silene acaulis* despite high gene flow. *Heredity* **82**, 628-637.
- Gentry A.H. 1988. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Ann. Missouri Bot. Garden.* **75**, 1-34.
- Gérard J., Edi Kouassi A., Daigremont C., Détienne P., Fouquet D., Vernay M. 1998. *Synthèse sur les caractéristiques technologiques de référence des principaux bois commerciaux africains*. Série FORAFRI document 11, CIRAD-Forêt, Montpellier, France.
- Gérard P.R., Klein E.K., Austerlitz F., Fernández-Manjarrés J-F., Frascaria-Lacoste N. 2006. Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *BMC Evol. Biol.* **6**, 96.
- GERDAT 1973. Iroko. *Bois et Forêts des Tropiques* **148**, 33-45.

- Giresse P., Mvoubou M., Maley J., Ngomanda A. 2008. Late-Holocene equatorial environments inferred from deposition processes, carbon isotopes of organic matter, and pollen in three shallow lakes of Gabon, west-central Africa. *J. Paleolimnol.* **41**, 369-392.
- Goudet J. 1995. Fstat (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity* **86**, 485-486.
- Grivet D., Petit R.J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conserv. Genet.* **4**, 47-56.
- Guillot G., Estoup A., Mortier F., Cosson J. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**, 1261-1280.
- Guillot G., Leblois R., Coulon A., Frantz A.C. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Mol. Ecol.* **18**, 4734-4756.
- Hackett S.J. 1993. Phylogenetic and biogeographic relationships in the Neotropical genus *Gymnopithys* (Formicariidae). *Wilson Bulletin* **105**, 301-315.
- Haffer J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodivers. Conserv.* **6**, 451-476.
- Haider N. 2011. Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies. *Biol. Plant.* **55**, 225-236.
- Hall J.S., Swaine M.D. 1980. Seed stocks in Ghanaian forest soils. *Biotropica* **12**, 256-263.
- Hamann A. 2004. Flowering and fruiting phenology of a Philippine submontane rain forest: climatic factors as proximate and ultimate causes. *J. Ecol.* **92**, 24-31.
- Hamilton M.G., Miller J.R. 2002. Comparing relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures of population structure. *Genetics* **162**, 1897-1909.
- Hanson T.R., Brunfeldt S.J., Finegan B., Waits L.P. 2008. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Mol. Ecol.* **17**, 2060-2073.
- Hardy O.J. 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Mol. Ecol.* **12**, 1577-1588.
- Hardy O.J. 2009. *TOROCOR: a program to assess the association between spatially autocorrelated variables using a torus-translation test on multiple grids*. Université Libre de Bruxelles, Belgique.
- Hardy O.J., Charbonnel N., Freville H., Heuertz M. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* **163**, 1467-1482.
- Hardy O.J., Maggia L., Bandou E. et al. 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Mol. Ecol.* **15**, 559-571.
- Hardy O.J., Vekemans X. 1999. Isolation by distance in a continuous population: reconciliation between spatial autocorrelation analysis and population genetics models. *Heredity* **83**, 145-154.
- Hardy O.J., Vekemans X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* **2**, 618-620.
- Hawthorne W.D. 1995. *Ecological profiles of Ghanaian forest trees*. Tropical Forestry Paper 29, Oxford Forestry Institute, University of Oxford.
- Hawthorne W.D., Jongkind C. 2006. *Woody plants of Western African forests: a guide to the forest trees, shrubs and lianes from Senegal to Ghana*. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Hendry A.P., Day T. 2005. Population structure attributable to reproductive time: isolation by time and adaptation by time. *Mol. Ecol.* **14**, 901-916.
- Hendry A.P., Nosil P., Rieseberg L.H. 2007. The speed of ecological speciation. *Funct. Ecol.* **21**(3), 455-464.
- Hendry A.P., Wenburg J.K., Bentzen P., Volk E.C., Quinn T.P. 2000. Rapid evolution of reproductive isolation in the wild: evidence from introduced salmon. *Science* **290**, 516-518.
- Heuertz M., Carnevale S., Fineschi S. et al. 2006. Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridisation and life history traits. *Mol. Ecol.* **15**, 2131-2140.
- Heuertz M., Hausman J-F., Hardy O.J., Vendramin G.G., Frascaria-Lacoste N., Vekemans X. 2004. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between Western and Southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution* **58**, 976-988.
- Heuertz M., Savolainen V., Budde K.B. et al. 2010. Can Pleistocene refuge theory explain within-species patterns of genetic diversity in African lowland rainforest trees? In: IFORA, éd. *Colloque de restauration IFORA 2010*. Montpellier (France).
- Heuertz M., Vekemans X., Hausman J.F., Palada M., Hardy O.J. 2003. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Mol. Ecol.* **12**, 2483-2495.
- Hewitt G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**, 183-195.
- Hey J. 2006. On the failure of modern species concepts. *Trends Ecol. Evol.* **21**, 447-450
- Hirao A.S., Kudo G. 2008. The effect of segregation of flowering time on fine-scale spatial genetic structure in an alpine-snowbed herb *Primula cuneifolia*. *Heredity* **100**, 424-430.
- Hopkins M.S., Graham A.W. 1987. The viability of seeds of rainforest species after experimental soil burials under tropical wet lowland rainforest in north eastern Australia. *Aust. J. Ecol.* **12**, 97-108.
- Howe H.F., Smallwood J. 1982. Ecology of seed dispersal. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **13**, 201-228.
- Hu J., Zhu J., Xu H.M. 2000. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on genotypic values of crops. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 264-268.
- Hubbell S.P. 2001. *The Unified Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton University Press, Princeton.
- IUCN 2010. *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4*. IUCN, Cambridge, UK.
- Izawa T., Takahashi Y., Yano M. 2003. Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 113-120.
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.
- Jankowiak K., Buczkowska K., Szweykowska-Kulinska Z. 2005. Successful extraction of DNA from 100-year-old herbarium specimens of the liverwort *Bazzania trilobata*. *Int. Assoc. Plant Taxonomy* **54**(2), 335-336.
- Janzen D.H. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *Am. Nat.* **104**, 501-528.
- Jennings S.B., Brown N.D., Boshier D.H., Whitmore T.C. 2001. Ecology provides solution to the maintenance of genetic diversity in sustainably managed tropical rain forests. *Forest Ecol. Manag.* **154**, 1-10.
- Joker D. 2002. *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg. *Seed Leaflet* **63**. Available at: [http://www.dfsc.dk/pdf/Seedleaflets/Milicia %20excelsa_63_int.pdf](http://www.dfsc.dk/pdf/Seedleaflets/Milicia%20excelsa_63_int.pdf).

- Jump A.S., Penuelas J. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *P. Natl. A. Sci. USA* **103**, 8096-8100.
- Kalko E.K.V., Herre E.A., Handley C.O. 1996. Relation of fig fruit characteristics to fruit-eating bats in the New and Old World tropics. *J. Biogeogr.* **23**, 565-576.
- Kankam B.O., Oduro W. 2009. Frugivores and fruit removal of *Antiaris toxicaria* (Moraceae) at Bia Biosphere Reserve, Ghana. *J. Trop. Ecol.* **25**, 201-204.
- Kastner T.P., Goñi M.A. 2003. Constancy in the vegetation of the Amazon Basin during the late Pleistocene: Evidence from the organic matter composition of Amazon deep sea fan sediments. *Geology* **31**, 291-294.
- Katumba B.M., Boffa J.M., Abigaba G., Okorio J. 2004. Domestication of medicinal tree species in the Victoria lakeshore region. *Uganda J. Agric. Sci.* **9**, 84-88.
- Kelly C.A. 1993. Quantitative genetics of size and phenology of life-history traits in *Chamaecrista fasciculata*. *Evolution* **47**, 88-97.
- Koffi K.G. 2010. *Etude de la variabilité et de la phylogéographie de Santiria trimera* (Burseraceae) - *Implications pour une conservation durable des forêts humides d'Afrique*. Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, Belgique.
- Kouadio Y.L. 2009. *Mesures sylvicoles en vue d'améliorer la gestion des populations d'essences commerciales de l'Est du Cameroun*. Thèse de doctorat, Gembloux Agro-Bio Tech (ULg), Belgique.
- Kouadio Y.L., Doucet J-L. 2009. Etude du comportement de *Baillonella toxisperma* Pierre (moabi) dans les trouées d'abattage enrichies. *Biotechnol. Agron. Soc.* **13**, 317-324.
- Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A., Janzen D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *P. Natl. A. Sci. USA* **102**, 8369-8374.
- Küper W., Sommer J.H., Lovett J.C. et al. 2004. Africa's hotspots of biodiversity redefined. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **91**, 525-536.
- Laclavère G. 1979. *Atlas de la République Unie du Cameroun*. Jeune Afrique, Paris, France.
- Lambertini C., Frydenberg J., Gustafsson M.H.G., Brix H. 2008. Herbarium specimens as a source of DNA for AFLP fingerprinting of *Phragmites* (Poaceae): possibilities and limitations. *Plant Syst. Evol.* **272**, 223-231.
- Latch E.K., Dharmarajan G., Glaubitz J.C., Rhodes O.E. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conserv. Genetics* **7**, 295-302.
- Laurenty E. 2009. *Ecologie de régénération de Milicia excelsa au sud-est du Cameroun: dispersion et dormance des semences*. Mémoire de fin d'études, Gembloux Agro-Bio Tech, ULg, Belgique.
- Leal M.E. 2004. The African rain forest during the Last Glacial Maximum, an archipelago of forests in a sea of grass. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Léandri J. 1948. Contribution à l'étude des Moracées de Madagascar (Moroideae). *Mem. Inst. Sci. Madag. Ser. B* **1**, 1-37.
- Leblois R., Estoup A., Streiff R. 2006. Genetics of recent habitat contraction and reduction in population size: does isolation by distance matter? *Mol. Ecol.* **15**, 3601-3615.
- Ledig F.T. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *OIKOS* **63**, 87-108.
- Leigh E.G. 2007. Neutral theory: a historical perspective. *J. Evol. Biol.* **20**(6), 2075-2091.

- Levin S.A., Muller-Landau C., Nathan R., Chave J. 2003. The ecology and evolution of seed dispersal: a theoretical perspective. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **34**, 575-604.
- Lézine A.M. 2007. Postglacial pollen records of Africa. In: Elias SA., eds. *Encyclopaedia of Quaternary Sciences*, Vol. 4. Elsevier, Amsterdam, 2682-2698.
- Lieberman D. 1982. Seasonality and phenology in a dry tropical forest in Ghana. *J. Ecol.* **70**, 791-806.
- Linder H.P. 2001. Plant diversity and endemism in sub-Saharan tropical Africa. *J. Biogeogr.* **28**, 169-182.
- Linder H.P., Hardy C.R. 2004. Evolution of the species-rich Cape flora. *Philos. T. Roy. Soc. Lond. B* **359**, 1623-1632.
- Lippé C. 2006. *Conservation génétique du chevalier cuivré (Moxostoma hubbsi): effet tampon du temps de génération sur l'érosion de la diversité génétique*. Mémoire de MSc, Université Laval, Canada.
- Lira C.F., Cardoso S.R.S., Ferreira P.C.G., Cardoso M.A., Provan J. 2003. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Mol. Ecol.* **12**, 3219-3225.
- Lobo J.A., Quesada M., Stoner K.E. et al. 2003. Factors affecting phenological patterns of bombacaceous trees in seasonal forests in Costa Rica and Mexico. *Am. J. Bot.* **90**, 1054-1063.
- Loiselle B.A., Sork V.L., Nason J., Graham C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria Officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* **82**, 1420-1425.
- Lopes J.S., Balding D., Beaumont M.A. 2009. PopABC: a program to infer historical demographic parameters. *Bioinformatics* **25**, 2747-2749.
- Loveless M.D., Hamrick J.L. 1984. Determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **15**, 65-95.
- Lovett J.C., Friis I. 1996. Patterns of endemism in the woody flora of northeast and east Africa. In: van der Maesen L.J.G., van der Burgt X.M., van Medenbach de Rooy J.M., eds. *The biodiversity of African plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 582-601.
- Lowe A.J., Gillies A.C.M., Wilson J., Dawson I.K. 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Mol. Ecol.* **9**, 831-841.
- Lowe A.J., Harris D., Dormontt E., Dawson I.K. 2010. Testing putative African tropical refugia using chloroplast and nuclear DNA phylogeography. *Trop. Plant Biol.* **3**, 50-58.
- Luikart G., Allendorf F.W., Cornuet J.-M., Sherwin W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* **89**(3), 238-247.
- Luna R., Epperson B.K., Oyama K. 2005. Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. *Heredity* **95**, 298-305.
- Lyons E.E., Mully T.W. 1992. Density effects on flowering phenology and mating potential in *Nicotiana glauca*. *Oecologia* **91**, 93-100.
- Mahoro S. 2002. Individual flowering schedule, fruit set, and flower and seed predation in *Vaccinium hirtum* Thunb. (Ericaceae). *Can. J. Bot.* **80**, 82-92.
- Maley J. 1991. The African rain forest vegetation and paleoenvironments during late Quaternary. *Clim. Change* **19**, 79-98.

- Maley J. 1996. The African rain forest – main characteristics of changes in vegetation and climate from the Upper Cretaceous to the Quaternary. *Proc. R. Soc. Edinburgh* **104b**, 31-73.
- Maley J. 1999. L'expansion du palmier à huile (*Elaeis guineensis*) en Afrique Centrale au cours des trois derniers millénaires: nouvelles données et interprétations. In: Bahuchet S. et al., eds. *L'homme et la forêt tropicale*. Travaux Société d'Ecologie Humaine, Marseille, 237-254.
- Maley J., Brenac P. 1998. Vegetation dynamics, palaeoenvironments and climatic changes in the forests of western Cameroon during the last 28,000 years B.P. *Rev. Paleobot. Palynol.* **99**, 157-187.
- Mallet J. 2010. Why was Darwin's view of species rejected by twentieth century biologists? *Biol. Philos.* **25**, 497-527.
- Mancini F., Apetorgbor M., Cobbinah J.R., Ragazzi A. 2001. Potential of fungal pathogens on seeds and seedlings of *Milicia excelsa* in three ecological zones of Ghana. *J. Plant Dis. Prot.* **108**, 31-38.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**, 209-220.
- Marquis R.J. 1988. Phenological variation in the neotropical understory shrub *Piper arieianum*: causes and consequences. *Ecology* **69**, 1552-1565.
- Marshall H.D., Newton C., Ritland K. 2001. Sequence-repeat polymorphisms exhibit the signature of recombination in lodgepole pine chloroplast DNA. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 2136-2138.
- Matsushima R., Hu Y., Toyoda K., Sodmergen, Sakamoto W. 2008. The model plant *Medicago truncatula* exhibits biparental plastid inheritance. *Plant Cell. Physiol.* **49**, 81-91.
- Mauriès G. 1970. Epoque des premières importations de bois exotiques. *Bull. Inf. Centre Technique des Bois de Guyane* **53**, 27-29.
- Mayaux P., Bartholomé E., Fritz S., Belward A. 2004. A new land-cover map of Africa for the year 2000. *J. Biogeogr.* **31**, 861-877.
- Mayaux P., Defourny P., Devers D., Hansen M., Duveiller G. 2006. Cartographie et évolution du couvert forestier en Afrique Centrale. In: Devers D., Vande Weghe J-P., eds. *Les Forêts du Bassin du Congo - Etat des Forêts 2006*. CARPE, Maryland, USA, 80-89.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, USA.
- Mayr E. 1957. Species concepts and definitions. In: Mayr E., eds. *The Species Problem*. American Association for the Advancement of Science, Washington DC, 1 - 22.
- Mazer S.J. 1987. The quantitative genetics of life history and fitness components in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae): ecological and evolutionary consequences of seed-weight variation. *Am. Nat.* **130**, 891-914.
- McNeely J.A., Miller K.R., Reid W.V., Mittermeier R.A., Werner T.B. 1990. *Conserving the world's biological diversity*. Gland, Switzerland: IUCN.
- Meloni M., Perini D., Binelli G. 2007. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations in the western Alps. *J. Biogeogr.* **34**, 929-938.
- Michaud H., Lumaret R., Romane F. 1992. Variation in the genetic structure and reproductive biology of holm oak populations. *Vegetatio* **99**(100), 107-113.
- Miller W. 2001. The structure of species, outcomes of speciation and the 'species problem': ideas for paleobiology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **176**, 1-10.

- Mishra R.M., Gupta P. 2005. Frugivory and seed dispersal of *Carissa spinarum* (L.) in a tropical deciduous forest of central India. *Tropical Ecology* **46**, 151-156.
- Mollet M., Téré H., Herzog F. 2000. Ligneux à usages multiples dans les systèmes agraires tropicaux: une étude de cas de Côte d'Ivoire. *Schweiz. Z. Forstwes.* **151**, 355-364.
- Mollet M., Tiki-Manga T., Kengue J., Tchoundjeu Z. 1995. The «top 10» species in Cameroon: a survey of farmers' views on trees. *Agroforestry Today* **7**, 3-4.
- Monteiro L.R., Furness R.W. 1998. Speciation through temporal segregation of Madeiran storm petrel (*Oceanodroma castro*) populations in the Azores? *Philos. T. R. Soc. B.* **353**, 945-953.
- Morellato L.P.C., Camargo M.G.G., D'Eça Neves F.F., Luize B.G., Mantovani A., Hudson I.L. 2010. The influence of sampling method, sample size, and frequency of observations on plant phenological patterns and interpretation in tropical forest trees. In: Hudson I.L., Keatley M.R., eds. *Phenological Research*. Springer Science and Business Media, Berlin, Germany, 99-121.
- Morellato L.P.C., Talora D.C., Takahasi A., Bencke C.C., Romera E.C. 2000. Phenology of Atlantic rainforest trees: a comparative study. *Biotropica* **32**, 811-823.
- Moritz C., Patton J.L., Schneider C.J., Smith T.B. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **31**, 533-63.
- Muller-Landau HC., Wright S.J., Calderón O., Condit R, Hubbell SP., 2008. Interspecific variation in primary seed dispersal in a tropical forest. *J. Ecol.* **96**, 653-667.
- Muloko-Ntoutoume N., Petit R.J., White L., Abernethy K. 2000 Chloroplast DNA variation in a rainforest tree (*Aucoumea klaineana*, Burseraceae) in Gabon. *Mol. Ecol.* **9**, 359-363.
- Namkoong G., Boyle T., Gregorius H-R. et al. 1996. *Testing criteria and indicators for assessing the sustainability of forest management: genetic criteria and indicators*. Working Paper n°10, CIFOR.
- Nanson A. 2004. *Génétique et amélioration des arbres forestiers*. Gembloux: les presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.L, Belgique.
- Nason J.D., Hamrick J.L. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *J. Hered.* **88**, 264-276.
- Nason J.D., Herre E.A., Hamrick J.L. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature* **391**, 685-687.
- Nathan R., Safriel U.N., Noy-Meir I., Schiller G. 2000. Spatiotemporal variation in seed dispersal and recruitment near and far from *Pinus halepensis* trees. *Ecology* **81**, 2156-2169.
- Ndiade-Bourobou D., Hardy O.J., Favreau B. et al. 2010. Long-distance seed and pollen dispersal inferred from spatial genetic structure in the very low-density rainforest tree, *Baillonella toxisperma* Pierre, in Central Africa. *Mol. Ecol.* **19**, 4949-4962.
- Ngomanda A., Jolly D., Bentaleb I. et al. 2007. Lowland rainforest response to hydrological changes during the last 1500 years in Gabon, Western Equatorial Africa. *Quat. Res.* **67**, 411-425.
- Nichols J.D., Agurgo F.B., Agyeman V.K., Wagner M.R., Cobbinah J.R. 1998. Distribution and abundance of *Milicia excelsa* species in Ghana. *Ghana J. For.* **6**, 1-7.
- Nichols J.D., Agyeman V.K., Agurgo F.B., Wagner M.R., Cobbinah J.R. 1999. Patterns of seedling survival in the tropical African tree *Milicia excelsa*. *J. Trop. Ecol.* **15**(4), 451-461.

- Nkounkou-Loumpangou C., Binimbi-Massengo A., Nzonzi J., Ouamba J.-M., Abena A.A., Diatwa M. 2005. Inventaire des plantes médicinales utilisées dans le traitement de l'infertilité féminine à Brazzaville. *Phytothérapie* **6**, 252-259.
- Nolte A.W., Freyhof J., Stemshorn K.C., Tautz D. 2005. An invasive lineage of sculpins, *Cottus* sp. (Pisces, Teleostei) in the Rhine with new habitat adaptations has originated from hybridization between old phylogeographic groups. *P. Roy. Soc. B* **272**, 2379-2387.
- Nunney L. 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* **47**, 1329-1341.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* **13**, 1143-1155.
- Nyong'o R.N., Cobbinah J.R., Appiah-Kwarteng J. 1994. Flowering and fruiting patterns in *Milicia excelsa* and *Milicia regia* Welw. *Ghana J. For.* **1**, 19-29.
- Ofori D.A. 2007a. *Milicia excelsa* (Welw.) C.C.Berg. In: Louppe D., Oteng-Amoako A.A., Brink M., eds. *Prota: Timbers/Bois d'œuvre 1*. PROTA, Wageningen, Netherlands.
- Ofori D.A. 2007b. *Milicia regia* (A.Chev.) C.C.Berg. In: Louppe D., Oteng-Amoako A.A., Brink M., eds. *Prota: Timbers/Bois d'œuvre 1*. PROTA, Wageningen, Netherlands.
- Ofori D.A., Cobbinah J.R. 2007. Integrated approach for conservation and management of genetic resources of *Milicia* species in West Africa. *Forest Ecol. Manag.* **238**, 1-6.
- Ofori D.A., Swaine M.D., Cobbinah J.R., Price H. 2003. Genetic diversity and biodiversity conservation guidelines for *Milicia* species in Ghana. *Ghana J. For.* **11**, 27-38.
- Ofori D.A., Swaine M.D., Leifert C., Cobbinah J.R., Price A.H. 2001. Population genetic structure of *Milicia* species characterized by using RAPD and nucleotide sequencing L. *Genet. Resour. Crop Ev.* **48**, 637-647.
- Okon E.E. 1975. Fruit bats at Ife: their roosting and food preferences. *Nigerian Field* **39**, 33-40.
- Okullo J.B.L., Hall J.B., Obua J. 2004. Leafing, flowering and fruiting of *Vitellaria paradoxa* subsp. *nilotica* in savanna parklands in Uganda. *Agroforest. Syst.* **60**, 77-91.
- Ollerton J., Lack A.J. 1992. Flowering phenology - an example of relaxation of natural selection? *Trends Ecol. Evol.* **7**, 274-276.
- Osmaston H.A. 1965. Pollen and seed dispersal in *Chlorophora excelsa* and other Moraceae, and in *Parkii filicoidea* (Mimosaceae), with special reference to the role of the fruit bat, *Eidolon helvum*. *Commonwealth For. Rev.* **44**, 96-104.
- Ouinsavi C., Sokpon N. 2010. Morphological variation and ecological structure of iroko (*Milicia excelsa* Welw. C.C. Berg) populations across different biogeographical zones in Benin. *Int. J. For. Res.* DOI:10.1155/2010/658396.
- Ouinsavi C., Sokpon N., Bousquet J., Newton C.H., Khasa D.P. 2006. Novel microsatellite DNA markers for the threatened African endemic tree species, *Milicia excelsa* (Moraceae), and cross-species amplification in *Milicia regia*. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 480-483.
- Ouinsavi C., Sokpon N., Kasha D.P. 2009. Genetic diversity and population structure of a threatened African tree species, *Milicia excelsa*, using nuclear microsatellites DNA markers. *Int. J. For. Res.* DOI: 10.1155/2009/210179.
- Padial J.M., Miralles A., De la Riva I., Vences M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* **7**, 16.

- Palmé A.E., Vendramin G.G. 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Mol. Ecol.* **11**, 1769-1779.
- Pangou V.S., Bouki T. 2011. Influence of climate on the yearly fluctuations of flowering of *Pterocarpus soyauxii* Taubert. at Mayombe in Congo. *Int. Res. J. Plant Sci.* **2**, 46-59.
- Parmentier I., Harrigan R.J., Buermann W. et al. 2011. Predicting alpha diversity of African rain forests: models based on climate and satellite-derived data do not perform better than a purely spatial model. *J. Biogeogr.* **38**, 1164-1176.
- Parmentier I., Malhi Y., Senterre B. et al. 2007. The odd man out? Might climate explain the lower tree α -diversity of African rain forests relative to Amazonian rain forests? *J. Ecol.* **95**, 1058-1071.
- Pascual M., Chapuis M.P., Mestres F. et al. 2007. Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Mol. Ecol.* **16**, 3069-3083
- Pautasso M. 2009. Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **11**, 157-189.
- Pendje G. 1994. *Stratégies de régénération de neuf essences commerciales de forêt tropicale (Mayombe, Zaïre)*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie (France).
- Pennington R.T., Cronk Q.C.B., Richardson J.A. 2004. Introduction and synthesis: plant phylogeny and the origin of major biomes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**, 1455-1464.
- Petit R.J., Duminil J., Fineschi S. et al. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* **14**, 689-701.
- Petit R.J., Aguinagalde I., Beaulieu J-L. et al. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* **300**, 1563-1565.
- Petit R.J., Hampe A. 2006. Some evolutionary consequences of being a tree. *Ann. Rev. Eol. Evol. Syst.* **37**, 187-214.
- Petit R.J., Jouzel J., Raynaud D. et al. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok Ice Core. *Nature* **399**, 429-436.
- Philipps O.L., Hall P., Gentry A.H., Sawyer S.A., Vasquez R. 1994. Dynamics and species richness of tropical rain forests. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 2805-2809.
- Pianka E.R. 1966. Latitudinal gradients in species diversity: a review of concepts. *Am. Nat.* **100**, 33-46.
- Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Heredity* **86**, 502-503.
- Plana V. 2004. Mechanisms and tempo of evolution in the African Guineo-Congolian rainforest. *Philos. T. Roy. Soc. Lond. B* **359**, 1585-1594.
- Plenderleith K., Brown N. 2004. *Baillonella toxisperma*: a state of knowledge study. In: Clark L.E. Sunderland T.C.H., eds. *The Key Non-Timber Forest Products of Central Africa: State of the Knowledge*. USAID Technical Paper 122, Washington, USA, 141-161.
- Pons O., Petit R.J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* **144**, 1237-1245.
- Prance G.T. 1982. Forest refuges: evidence from woody angiosperms. In: Prance G.T., eds. *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York, USA, 137-157.

- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Provan J., Biss P.M., McMeel D., Mathews S. 2004. Universal primers for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). *Mol. Ecol. Notes* **4**, 262-264.
- Purrlington C.B., Schmitt J. 1998. Consequences of sexual dimorphic timing of emergence and flowering in *Silene latifolia*. *J. Ecol.* **86**, 397-404.
- Raponda-Walker A., Sillans R. 1995. *Les plantes utiles du Gabon*. Edition Sépia, Libreville, Gabon.
- Raspé O., Saumitou-Laprade P., Cuguen J., Jacquemart A.L. 2000. Chloroplast DNA haplotype variation and population differentiation in *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae). *Mol. Ecol.* **9**, 1113-1122.
- Rathcke B., Lacey E.P. 1985. Phenological patterns of terrestrial plant. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **16**, 179-214.
- Ratiarison S., Forget P-M. 2005. Frugivores and seed removal at *Tetragastris altissima* (Burseraceae) in a fragmented forested landscape of French Guiana. *J. Trop. Ecol.* **21**, 501-508.
- Raymond M., Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* **86**, 248-249.
- Reed D.H., Frankham R. 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* **55**, 1095-1103.
- Reed D.H., Frankham R. 2003. Population fitness is correlated with genetic diversity. *Conserv. Biol.* **17**, 230-237.
- Rendle A.B. 1916. Moraceae. In: Prain D., eds. *Flora of Tropical Africa* 6/2. Reeve, London, UK, 19-78.
- Rice W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rice W.R., Hostert E.E. 1993. Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* **47**, 1637-1653.
- Richter H.V., Cumming G.S. 2008. First application of satellite telemetry to track African straw-coloured fruit bat migration. *J. Zool.* **275**, 172-178.
- Richter H.V., Walsch A. 2006. The greatest migration in Africa – Unlocking the mysteries of the Straw-Colored Fruit Bat. *AZA Magazine - Communiqué* 24-26.
- Ricklefs R.E., Miller G.L. 2005. *Ecologie*. Editions De Boeck Université, Bruxelles, Belgique.
- Rietkerk M., Ketner P., de Wilde J.J.F.E. 1996. Caesalpinioideae and the study of forest refuges in central Africa. In: van der Maesen L.J.G., van der Burgt X.M., van Medenbach de Rooy J.M., eds. *The biodiversity of African plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands, 618-623.
- Rind D. 1995. Drying out the Tropics. *New Scientist* **5**, 36-40.
- Rivera G., Elliott, H., Caldas L.S., Nicolossi G., Coradin V.T.R., Borchert R. 2002. Increasing day-length induces spring flushing of tropical dry forest trees in the absence of rain. *Trees* **16**, 445-456.
- Robbrecht E. 1996. Geography of African Rubiaceae with reference to glacial rain forest refuges. In: van der Maesen L.J.G., van der Burgt X.M., van Medenbach de Rooy J.M., eds. *The biodiversity of African plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, 564-581.
- Roberts A.M.I., Last F.T., Kempton, E. 2004. *Preliminary analyses of changes in the first flowering dates of a range of plants between 1978 and 2001*. Scottish Natural Heritage Commissioned, Report No. 035, Edinburgh.

- Robinson R.A., Learmonth J.A., Hutson A.M. et al. 2005. *Climate change and migratory species*. BTO Research Report 414. Norfolk: British Trust of Ornithology.
- Robledo-Arnuncio J.J., Alía R., Gil L. 2004. Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Mol. Ecol.* **13**, 2567-2577.
- Robledo-Arnuncio J.J., Austerlitz F., Smouse P.E. 2006. A new method of estimating the pollen dispersal curve independently of effective density. *Genetics* **173**, 1033-1045.
- Roda J.M. 2007. L'économie globale du bois tropical. In: Cadène P., éd. *La mondialisation, l'intégration des pays en développement*. SEDES, Paris, France, 105-116.
- Rosenberg N.A. 2004. *Distruct*: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol.* **4**, 137-138.
- Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset F. 2000. Genetic differentiation between individuals. *J. Evol. Biol.* **13**, 58-62.
- Rousset F. 2008. GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* **8**, 103-106.
- Salo J. 1987. Pleistocene forest refuges in the Amazon: evaluation of the biostratigraphical, lithostratigraphical and geomorphological data. *Ann. Zool. Fennici* **24**, 203-211.
- Salzmann U., Hoelzmann P. 2005. The Dahomey Gap: an abrupt climatically induced rain forest fragmentation in West Africa during the late Holocene. *The Holocene* **15**, 190-199.
- Sato T., Isagi Y., Sakio H., Osumi K., Goto S. 2006. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. *Heredity* **96**, 79-84.
- Sayer J.A., Maginnis S. 2005. *Forests in landscapes: ecosystem approaches to sustainability*. Cambridge: IUCN.
- Schluter D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* **323**, 737-741.
- Schupp E.W. 1993. Quantity, quality and the effectiveness of seed dispersal by animals. *Vegetation* **107**(108), 15-29.
- Sen S., Sivrikaya H., Yalçın M. 2009. Natural durability of heartwoods from European and tropical Africa trees exposed to marine conditions. *Afr. J. Biotechnol.* **8**, 4425-4432.
- Sepulchre F., Daïnou K., Doucet J-L. 2008. *Etude de la vulnérabilité de 18 essences ligneuses commerciales d'Afrique Centrale reprises dans la liste rouge IUCN*. ATIBT, Paris.
- Sheil D., Van Heist M. 2000. Ecology for tropical forest management. *Int. For. Rev.* **2**, 261-270.
- Sibley C.G., Ahlquist J.E. 1990. *Phylogeny and classification of birds. A study in molecular evolution*. Yale University Press, New Haven, USA.
- Silvertown J., Servaes C., Biss P., Macleod D. 2005. Reinforcement of reproductive isolation between adjacent populations in the Park Grass Experiment. *Heredity* **95**, 198-205.
- Sim T.R. 1909. *Forest flora and forest resources of Portuguese East Africa*. Taylor and Henderson, Aberdeen, Scotland.
- Singh K.P., Kushwaha C.P. 2006. Diversity of flowering and fruiting phenology of trees in a tropical deciduous forest in India. *Ann. Bot. London* **9**, 265-276.

- Smith T.B., Schneider C.J., Holder K. 2001. Refugial isolation versus ecological gradients. Testing alternative mechanisms of evolutionary divergence in four rainforest vertebrates. *Genetica* **112-113**, 383-398.
- Smouse P.E., Dyer R.J., Westfall R.D., Sork V.L. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* **55**, 260-271.
- Smouse P.E., Sork V.L. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *Forest Ecol. Manag.* **197**, 21-38.
- Snaydon R.W., Davies M.S. 1976. Rapid population differentiation in a mosaic environment - IV. Populations of *Anthoxanthum odoratum* at sharp boundaries. *Heredity* **37**, 9-25.
- Snow D.W. 1965. A possible selective factor in the evolution of fruiting seasons in tropical forest. *Oikos* **15**, 274-281.
- Sonke B. 1998. *Etudes floristiques et structurales des forêts de la réserve de faune du Dja (Cameroun)*. Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, Belgique.
- Sork V.L., Davis F.W., Smouse P.E. et al. 2002. Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? *Mol. Ecol.* **11**, 1657-1668.
- Sosef M.S.M. 1996. Begonias and African rain forest refuges. In: van der Maesen L.J.G., van der Burgt X.M., van Medenbach de Rooy J.M., eds. *The Biodiversity of african plants*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 602-611.
- Sparks T.H., Carey P.D. 1995. The responses of species to climate over two centuries: an analysis of the Marsham phenological record, 1736-1947. *J. Ecol.* **83**, 321-329.
- Spencer C.C., Neigel J.E., Leberg P.L. 2000. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Mol. Ecol.* **9**, 1517-1528.
- Steinkellner H., Lexer C., Turetschek E., Glössl J. 1997. Conservation of (GA) in microsatellite loci between *Quercus* species. *Mol. Ecol.* **6**, 1198-1194.
- Stephenson A.G. 1981. Flower and fruit abortion: proximal causes and ultimate function. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **12**, 253-279.
- Sun Y., Skinner D.Z., Liang G.H., Hulbert S.H. 1994. Phylogenetic analysis of sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genetics* **89**, 26-32.
- Szaro R.B., Boyce D.A., Puchlerz T. 2005. The challenges associated with developing science-based landscape scale management plans. *Landscape Urban Plan.* **72**, 3-12.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1105-1109.
- Tabuti J.R.S. 2007. The uses, local perceptions and ecological status of 16 woody species of Gadnumire Sub-county, Uganda. *Biodivers. Conserv.* **16**, 1901-1915.
- Tanaka K., Tsumura Y., Nakamura T. 1999. Development and polymorphism of microsatellites markers for *Fagus crenata* and the closely related species *F. japonica*. *Theor. Appl. Genetics* **99**, 11-15.
- Tarasov P.E., Volkova V.S., Webb T. et al. 2000. Last glacial maximum biomes reconstructed from pollen and plant macrofossil data from northern Eurasia. *J. Biogeogr.* **27**, 609-620.
- Tarayre M., Bowman G., Schermann-Legionnet A., Barat M., Atlan A. 2007. Flowering phenology of *Ulex europaeus*: ecological consequences of variation within and among populations. *Evol. Ecol.* **21**, 395-409.

- Taylor D.A.R., Kankam B.O., Wagner M.R. 1999. *The role of the fruit bat Eidolon helvum in seed dispersal, survival, and germination in Milicia excelsa, a threatened West African hardwood*. Northern Arizona University, Flagstaff (AZ) and For. Res. Inst. Ghana, Kumasi (Ghana). Available at: <http://www.for.nau.edu/cms/content/view/521/715>.
- Thies E. 1995. *Principaux ligneux (agro-)forestiers de la Guinée – Zone de transition*. GTZ n°253. GTZ im TZ-Verlag, Bonn, Germany.
- Thomas D.W. 1983. The annual migrations of 3 species of West-African fruit bats (Chiroptera, Pteropodidae). *Can. J. Zool.* **61**, 2266-2272.
- Thrall P.H., Jarosz A.M. 1994. Host-pathogen dynamics in experimental populations of *Silene alba* and *Ustilago violacea*. I. Ecological and genetic determinants of disease spread. *J. Ecol.* **82**, 549-559.
- Thuillet A.-C., Bru D., David J. et al. 2002. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp *durum* Desf. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 122-125.
- Tondeur G. 1939. Monographie forestière du *Chlorophora excelsa* Benth. et Hook. *Bulletin Agricole du Congo Belge* **30**, 163-198.
- Troupin D., Nathan R., Vendramin G.G. 2006. Analysis of spatial genetic structure in an expanding *Pinus halepensis* population reveals development of fine-scale genetic clustering over time. *Mol. Ecol.* **15**, 3617-3630.
- Tsumura Y., Kawahara T., Wickneswari R., Yoshimura K. 1996. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 22-29.
- Van Gemerden B.S., Olf H., Parren M.P.E., Bongers F. 2003. The pristine rain forest? Remnants of historical human impacts on current tree species composition and diversity. *J. Biogeogr.* **30**, 1381-1390.
- 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. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535-538.
- Vande Weghe J-P. 2004. *Forêts d'Afrique Centrale: la nature et l'homme*. Uitgeverij Lannoo, Belgique.
- Vekemans X., Hardy O.J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol. Ecol.* **13**, 921-935.
- Vincens A., Schwartz D., Bertaux J., Elenga H., de Namur C. 1998. Late Holocene climatic changes in Western Equatorial Africa inferred from pollen from Lake Sinnda, Southern Congo. *Quat. Res.* **50**, 34-45.
- Vogel M., Bänfer G., Moog U., Weising K. 2003. Development and characterization of chloroplast microsatellite markers in *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Genome* **46**, 845-857.
- Voysey B.C., McDonald K.E., Rogers M.E., Tutin C.E.G., Parnell R.J. 1999. Gorillas and seed dispersal in the Lope Reserve, Gabon. II: survival and growth of seedlings. *J. Trop. Ecol.* **15**, 39-60.
- Wagner M.R., Cobbinah J.R., Adu-Bredu S. et al. 2002. Integrated Pest Management to Sustain Iroko Production in Ghana, West Africa. Forest Institute of Ghana. Available at: <http://www.for.nau.edu/ghana/irokopresentation/>.
- Wallace A.R. 1878. *Tropical nature and other essays*. Macmillan, London.
- Walther G.-R., Post E., Convey P., Menzel A. et al. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**, 389-395.

- Waters C.M. 2001. Guiding the delimitation of local provenance for Australian native grasses. In: STIPA Native Grass Association Inc., NSW, eds. *Our Valuable Native Grasslands, Better Pastures Naturally, Proceedings of the Second National Conference of the Native Grasses Association*. Available at: <http://www.regional.org.au/au/stipa/papers/stipa2001-09.htm>.
- WCMC 1998. *Contribution to an evaluation of tree species using the new CITES listing criteria*. World Conservation Monitoring Centre, UNEP-WCMC, Cambridge, UK.
- Weis A.E., Kossler T.M. 2004. Genetic variation in flowering time induces phenological assortative mating: quantitative genetic methods applied to *Brassica rapa*. *Am. J. Bot.* **91**, 825-836.
- Weising K., Gardner R.C. 1999. A set of conserved PVR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphism in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* **42**, 9-19.
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. *DNA Fingerprinting in plants: Principles, Methods, and Applications, Second Edition*. Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- Welwitsch F.M.J. 1869. *Sertum angolense*. *Trans. Linn. Soc. Bot.* **27**, 1-110.
- White F. 1979. The Guineo-Congolian Region and its relationship to other phytochoria. *Nat. Bot. Garden Belg.* **49**, 11-55.
- White F. 1983. *The Vegetation of Africa*. Natural Resources Research, UNESCO, Suisse.
- White G.M., Boshier D.H., Powell W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Mol. Ecol.* **8**, 1899-1909.
- White G.M., Boshier D.H., Powell W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *P. Natl. A. Sci.* **99**, 2038-2042.
- White L., Abernethy K. 1996. *Guide de la végétation de la Réserve de la Lopé, Gabon*. Projet Ecofac, Libreville, Gabon.
- White L.J.T. 1994. Patterns of fruit-fall phenology in the Lopé Reserve, Gabon. *J. Trop. Ecol.* **10**, 289-312.
- White L.J.T., Oates J. 1999. New data on the history of the plateau forest of Okomu, southern Nigeria: an insight into how human disturbance has shaped the African rain forest. *Global Geogr. Biogeogr.* **8**, 355-361.
- White M.G. 1966. A comparison of *Chlorophora excelsa* (Welw.) Benth and Hook (F.) and *C. regia* A. Chev., (Fam. Moraceae). *Commonwealth For. Rev.* **45**(124), 150-153.
- White T.L., Adams W.T., Neale D.B. 2007. *Forest genetics*. CABI Publishing, Cambridge, UK.
- Wiens D., Calvin C.L., Wilson C.A., Davern C.I., Frank D., Seavey S.R. 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. *Oecologia* **71**, 501-509.
- Wieringa J.J., Gervais G.Y.F. 2003. Phylogenetic analyses of combined morphological and molecular datasets on the *Aphanocalyx-Bikinia-Tetraberlinia* group (Leguminosae, Caesalpinioideae, Deterieae s.l.). In: Klitgaard B., Bruneau A., eds. *Advances in legume systematics, part 10, Higher level systematic*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 181-196.
- Williams C.F. 1994. Genetic consequences of seed dispersal in three sympatric forest herbs. II. Microspatial genetic structure within populations. *Evolution* **48**, 1959-1972.
- Willyard A., Syring J., Gernandt D.S., Liston A., Cronn R. 2006. Fossil calibration of molecular divergence infers a moderate mutation rate and recent radiations for *Pinus*. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 90-101.

- Wright S.J., Calderon O. 2005. Seasonal, El Nino and longer terms changes in flower and seed production in a moist tropical forest. *Ecol. Lett.* **9**, 35-44.
- Wright S.J., van Schaik C.P. 1994. Light and the phenology of tropical trees. *Am. Nat.* **143**, 192-199.
- Young A.G., Merriam H.G. 1994. Effects of forest fragmentation on the spatial genetic structure of *Acer saccharum* Marsh (Sugar Maple) populations. *Heredity* **72**, 201-208.
- Zaou P.K., Mapaga D., Nguema S.N., Deleporte P. 1998. Croissance de treize essences de bois d'œuvre plantées en forêt gabonaise. *Bois et Forêts des Tropiques* **256**, 21-32.

Annexe 1. Informations complémentaires du chapitre 4 (Article 2)

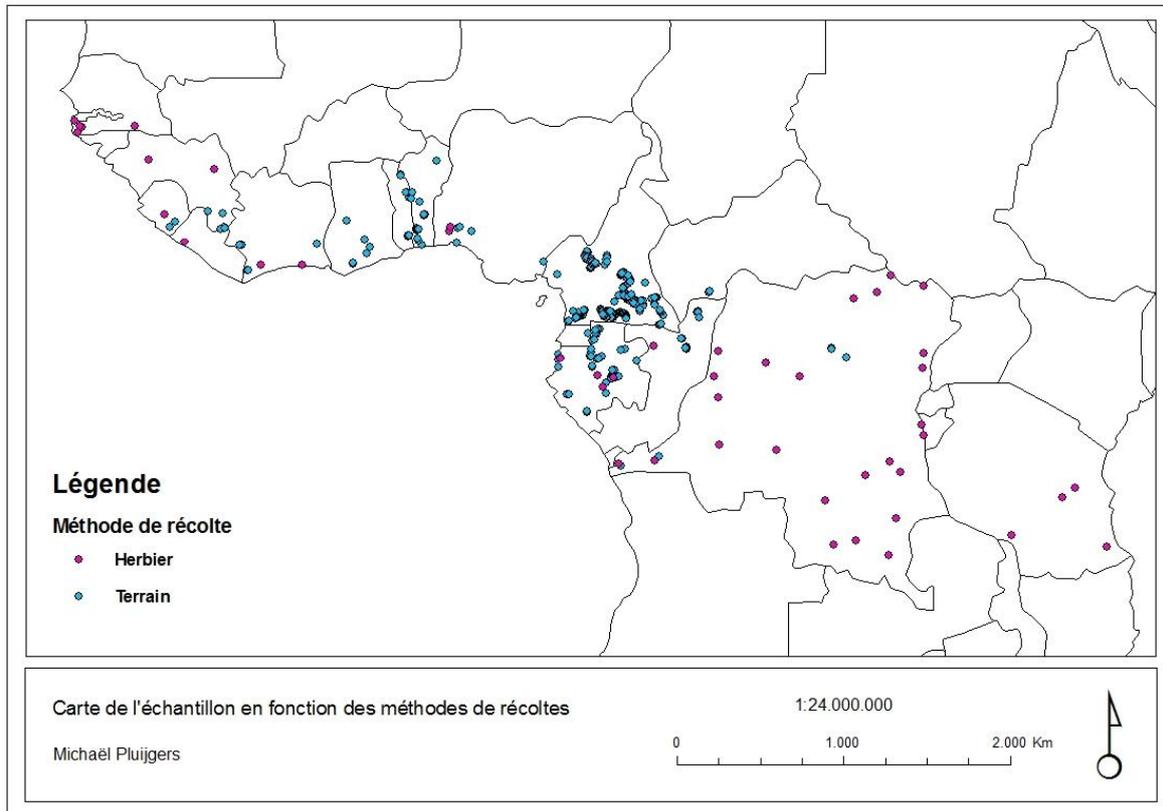


Figure S1. Localisation géographique des échantillons d'iroko génotypés. Points bleus: récoltes sur des arbres vivants; points roses: récoltes issues d'herbiers.

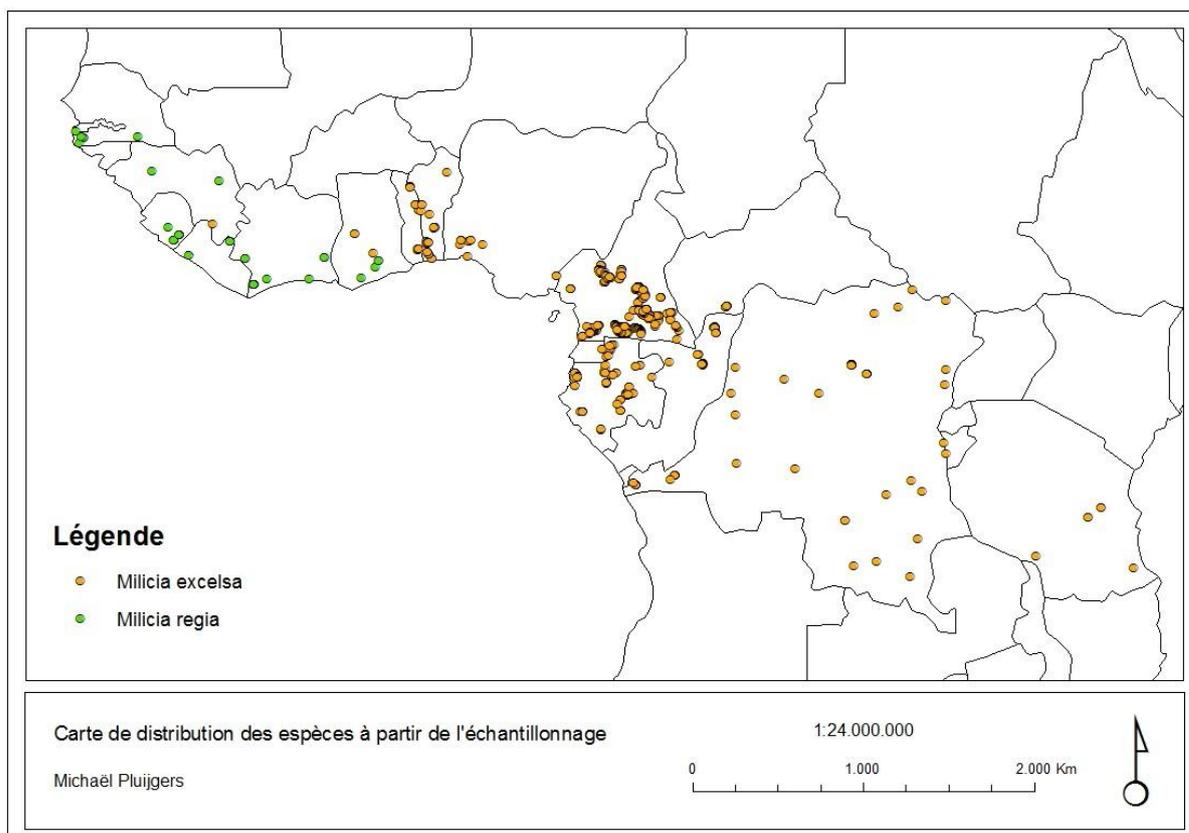


Figure S3. Distribution des deux espèces sur l'ensemble de la zone échantillonnée.

Tableau S1. Populations constituées et celles étudiées dans le cadre de la caractérisation de la diversité génétique. En gras, figurent les 23 populations avec un effectif ≥ 10 individus. D_{ij} est la distance entre les points extrêmes de la population.

Pays	Nom de la population	Code de population	Effectif (N)	D_{ij} max (km)
Gambie-Sénégal	Gambie-Sénégal	GS-1	6	357
Guinée Bissau	Guinée Bissau isolé	GB-1	1	
Sierra Leone	Sileti	SL-1	39	46
	Sierra Leone isolé	SL-3	1	
Guinée Conakry	Guinée Conakry	GC-1	11	130
Libéria	Libéria isolé	LI-1	1	
Côte d'Ivoire	Côte d'Ivoire	CI-1	23	558
Ghana	Ghana	GH-1	12	263
Bénin	Bénin	BE-1	40	511
Nigéria	Nigéria	NI-1	14	133
	Gundi	CA-1	15	71
	Megan	CA-2	10	55
	Belabo	CA-3	78	39
	Belabo-Mindourou	CA-4	10	65
	Mindourou	CA-5	113	55
	Biyeyem	CA-6	51	77
	Djoum	CA-7	55	166
	Makalaya	CA-8	18	30
	Yokadouma-Moloundou	CA-9	12	167
Mont-Koupé	CA-10	6	3	
Centrafrique	Centrafrique	CE-1	48	8
République du Congo	Ipendja	CO-1	21	9
	Pokola	CO-2	5	71
Gabon	Libreville	GA-1	19	75
	Ekarlong	GA-2	11	83
	Lastourville	GA-3	53	90
	Oyem	GA-4	7	67
	Makokou	GA-5	4	26
	Mandji	GA-6	6	13
	Popa	GA-7	4	1
	Gabon isolé	GA-8	3	430
RDC	Luki	RC-1	45	3,3
	Kinduala	RC-2	49	1,7
	Yangambi	RC-3	36	108
	RDC isolé	RC-4	18	1978
Burundi	Burundi	BU-1	1	
Tanzanie	Tanzanie	TA-1	4	97
	Tanzanie isolé	TA-2	2	569

Tableau S2. Modifications apportées au protocole d'extraction d'ADN du DNeasy Plant Mini kit QIAGEN

Étapes modifiées	Protocole initial	Nouveau protocole
<i>Ajout tampon AP1</i>	400 µl	450 µl
<i>Incubation des eppendorfs</i> (suite à l'ajout du tampon AP1)	10 mn	45 mn
<i>Ajout du tampon AP2</i>	130 µl	150 µl
<i>Précipitation à froid des "déchets" cellulosiques</i> (suite à l'ajout de tampon AP2 et avant la centrifugation)	5 mn sur glace	10 mn au congélateur
<i>Centrifugation à 15.000 tr/mn</i> (suite à la précipitation des "déchets")	5 minutes	10 minutes

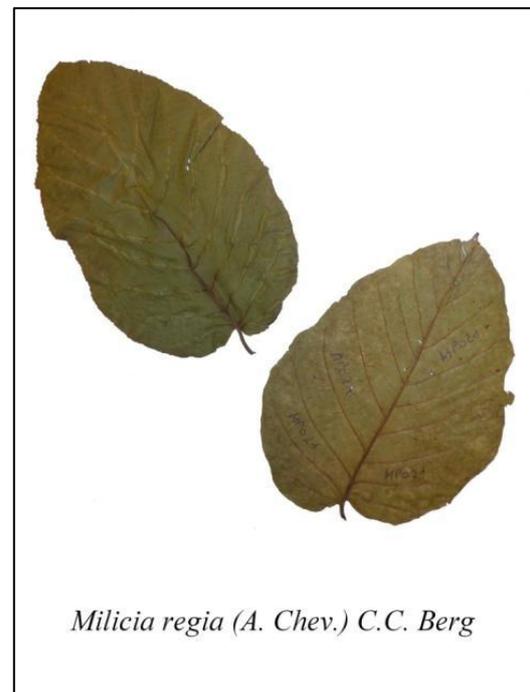
**Figure S4.** Comparaison des feuilles de *Milicia excelsa* et *M. regia* (Source: Pluijgers 2011)



Figure S5. Feuilles de juvéniles avec zoom macroscopique de *Milicia excelsa* (en haut) et de *Milicia regia* (en bas) (Source: Pluijgers 2011).

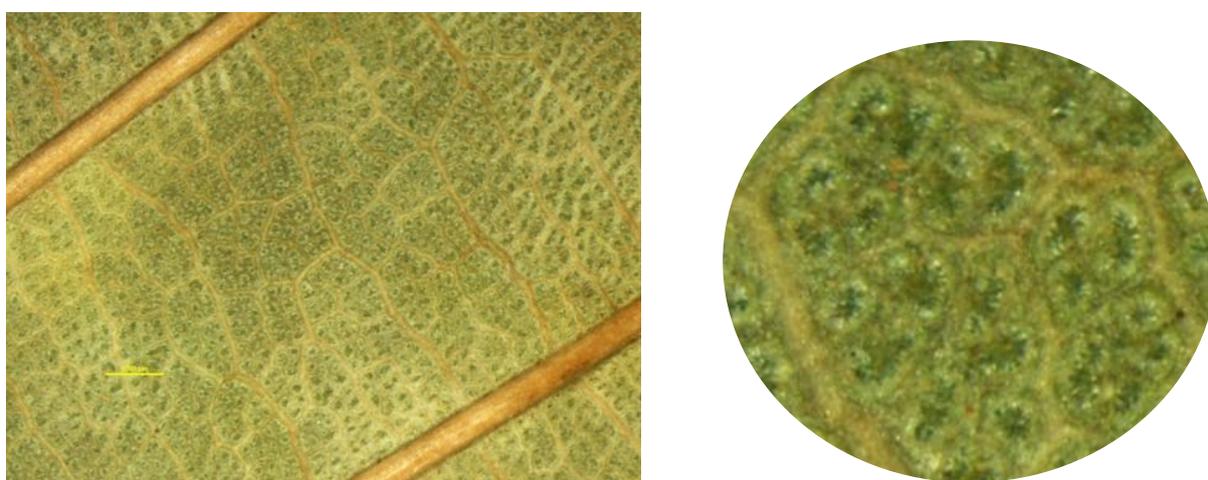


Figure S6. Espace inter-nervilles de *Milicia excelsa* sous différents grossissements (Source: Pluijgers 2011).

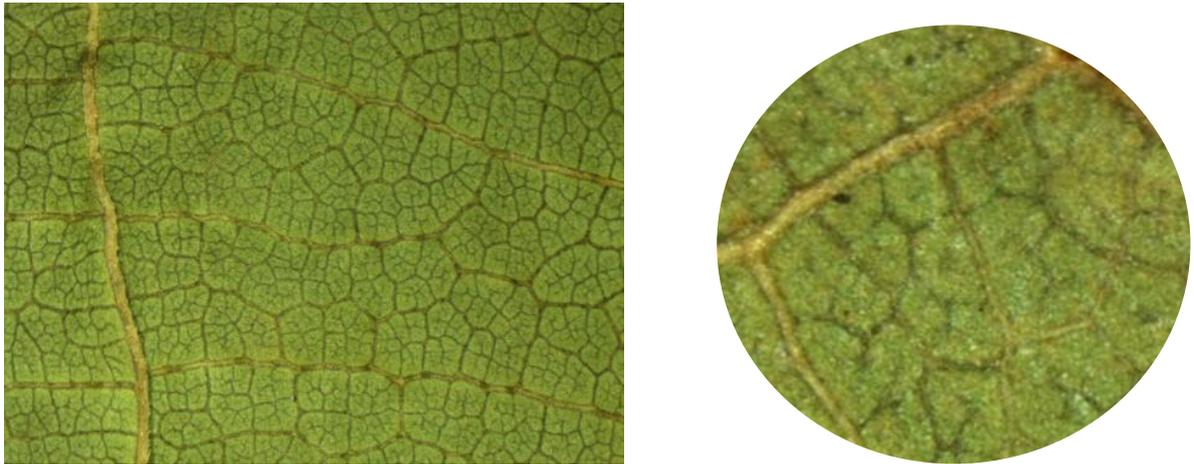


Figure S7. Espace inter-nervilles de *Milicia regia* sous différents grossissements (Source: Pluijgers 2011).

Tableau S3. Fréquences des allèles nuls par population et par marqueur (M1, M2, etc.). f_0 = fréquence des allèles nuls; SE = erreur standard.

Pays	Population	M1		M4		M5		M6		M8		M2		M7		Moyenne
		f_0	SE													
Sierra Leone	Sierra Leone	0,122	0,051	0,344	0,065	0,249	0,071	0,041	0,033	0,036	0,028	0,014	0,013	0,073	0,043	0,126
Guinée Conakry	Guinée Conakry	0,071	0,061	0,236	0,107	0,202	0,102	0,093	0,074	0,07	0,059	0,088	0,069	0,15	0,109	0,130
Côte d'Ivoire	Côte d'Ivoire	0,191	0,085	0,173	0,071	0,299	0,081	0,085	0,061	0,057	0,044	0,027	0,025	0,179	0,09	0,144
Ghana	Ghana	0,132	0,084	0,126	0,082	0,079	0,063	0,124	0,091	0,183	0,107	0,058	0,05	0,138	0,089	0,120
Bénin	Bénin	0,058	0,04	0,044	0,032	0,04	0,03	0,054	0,042	0,037	0,032	0,073	0,041	0,091	0,051	0,057
Nigéria	Nigéria	0,129	0,096	0,067	0,054	0,049	0,043	0,052	0,046	0,111	0,085	0,093	0,073	0,142	0,092	0,092
Cameroun	Gundi	0,157	0,11	0,081	0,066	0,127	0,086	0,107	0,077	0,064	0,055	0,151	0,085	0,218	0,111	0,129
	Megan	0,197	0,133	0,081	0,067	0,096	0,075	0,159	0,106	0,123	0,092	0,144	0,100	0,179	0,112	0,140
	Belabo	0,195	0,053	0,032	0,023	0,034	0,025	0,11	0,045	0,027	0,021	0,114	0,042	0,115	0,047	0,090
	Belabo-Mindourou	0,132	0,100	0,13	0,089	0,085	0,07	0,085	0,07	0,16	0,107	0,238	0,125	0,177	0,115	0,144
	Mindourou	0,036	0,025	0,075	0,032	0,039	0,025	0,023	0,019	0,027	0,021	0,068	0,034	0,076	0,038	0,049
	Biyeyem	0,219	0,065	0,082	0,048	0,044	0,032	0,038	0,031	0,049	0,035	0,109	0,051	0,13	0,057	0,096
	Djoum	0,065	0,050	0,057	0,04	0,06	0,038	0,143	0,054	0,045	0,034	0,115	0,055	0,143	0,061	0,090
	Makalaya	0,110	0,074	0,111	0,074	0,09	0,061	0,082	0,062	0,057	0,047	0,072	0,058	0,147	0,084	0,096
	Yokadouma-Moloundou	0,246	0,129	0,088	0,069	0,118	0,084	0,068	0,058	0,145	0,093	0,071	0,061	0,172	0,106	0,130
Centrafrique	Centrafrique	0,120	0,066	0,025	0,022	0,029	0,025	0,079	0,046	0,031	0,027	0,100	0,055	0,046	0,039	0,061
Congo-Brazzav.	Ipendja	0,188	0,099	0,056	0,046	0,064	0,051	0,157	0,085	0,146	0,083	0,057	0,047	0,066	0,053	0,105
Gabon	Libreville	0,140	0,098	0,109	0,069	0,06	0,05	0,081	0,061	0,078	0,06	0,118	0,077	0,07	0,055	0,094
	Ekarlong	0,223	0,126	0,169	0,099	0,089	0,073	0,110	0,083	0,106	0,084	0,109	0,079	0,212	0,117	0,145
	Lastourville	0,102	0,061	0,044	0,034	0,08	0,044	0,152	0,062	0,043	0,036	0,062	0,042	0,098	0,047	0,083
RD du Congo	Luki	0,089	0,064	0,078	0,041	0,064	0,041	0,049	0,038	0,046	0,038	0,107	0,059	0,073	0,043	0,072
	Kinduala	0,081	0,052	0,039	0,029	0,063	0,04	0,024	0,021	0,075	0,045	0,107	0,058	0,038	0,029	0,061
	Yangambi	0,104	0,067	0,068	0,046	0,125	0,055	0,044	0,036	0,07	0,045	0,075	0,052	0,064	0,047	0,079

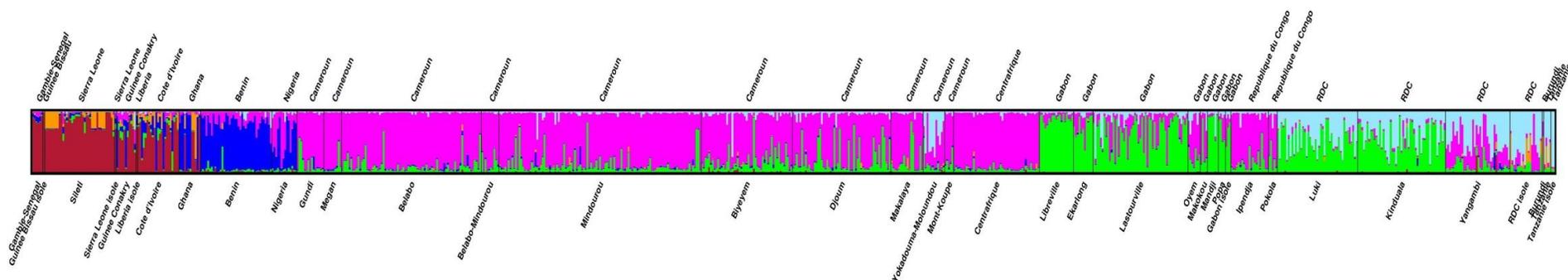


Figure S8. Illustration du partitionnement des génomes individuels dans les clusters, à l'aide de DISTRUCT. Chacun des 5 principaux clusters est représenté par une couleur: bordeaux = cluster 1, bleu foncé = cluster 2, rose = cluster 3, vert clair = cluster 4, et bleu clair = cluster 5. Un sixième cluster signalé par TESS dans certains cas apparaît, mais il ne détermine majoritairement aucun individu et a fortiori aucune population. Les populations sont présentées d'Ouest en Est, et du Nord vers le Sud.

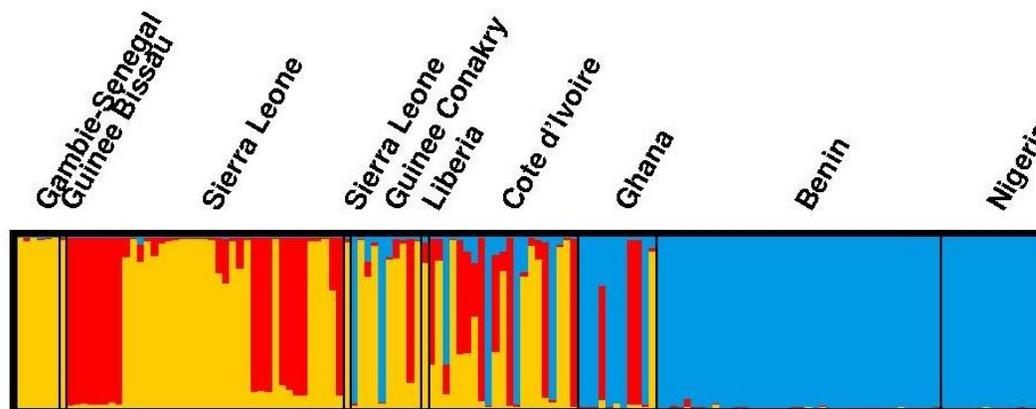


Figure S9. Illustration du partitionnement des génomes individuels en Afrique de l'Ouest.

Annexe 2. Supporting information of chapter 5 (Article 3)

Forest refugia revisited: SSRs and cpDNA sequences support historical isolation in a wide-spread African tree with high colonization capacity, *Milicia excelsa* (Moraceae)

Kasso Daïnou¹, Jean-Philippe Bizoux², Jean-Louis Doucet¹, Grégory Mahy², Olivier J. Hardy³, Myriam Heuertz^{3,4}

Table S1. Study populations.

Country	Population Codes	Population names	n	Latitude (decimal degrees)		Longitude (decimal degrees)	
				Min	Max	Min	Max
Benin	BE-1	Bassila	5	8.9544	8.9544	1.6470	1.6470
	BE-2	Niaouli	15	6.4100	7.2935	2.0806	2.3262
	CA-1	Belabo	78	4.6101	4.9133	13.0993	13.4235
	CA-2	Belabo-Pallisco	10	4.0811	4.4980	13.2181	13.6224
	CA-3	Biyeyem	52	2.3749	2.8469	10.6201	11.1381
	CA-4	Djoum	54	2.4073	2.9278	12.0026	13.3938
Cameroon	CA-5	Gundi	15	5.5099	6.0812	11.1331	11.5726
	CA-6	Makalaya	19	3.1122	3.3810	14.2700	14.3239
	CA-7	Megan	10	5.3259	5.8057	12.2233	12.3848
	CA-8	Mindourou	112	3.3637	3.7799	13.1449	13.6049
	CA-9	Mt_Koupe	5	4.7732	4.7987	9.6742	9.6845
CAR	CE-1	Mboko	48	3.8230	3.8848	17.8643	17.9079
RC	CO-1	Ipendja	21	2.7365	2.7752	17.2267	17.2975
	CO-2	Pokola	5	0.7543	1.3242	16.3940	16.6752
Gabon	GA-1	Ekarlong	11	-0.2199	0.3985	11.4534	12.0764
	GA-2	<i>Isolated individuals*</i>	3	-2.6771	0.7425	11.2501	13.9478
	GA-3	Lastourville	47	-1.0660	-0.4099	12.2998	12.9713
	GA-4	Libreville	19	-0.0662	0.6114	9.31795	9.5304
	GA-5	Makokou	4	0.6949	0.7628	13.1026	13.3258
	GA-6	Mandji	6	-1.7273	-1.7028	10.1749	10.2860
	GA-7	Oyem	7	1.2472	1.8372	11.3349	11.8209
	GA-8	Popa	4	-1.6412	-1.6354	12.2857	12.2906
Total			550	/			

* This is not a geographically contiguous population and was therefore not considered in Table 1 and Figure 1 in the manuscript

Table S2. Number of haplotypes defined by each of the 3 cpDNA regions.

	Lower Guinea	Benin	Total
<i>trnC-ycf6</i>	3	4	7
<i>psbA-trnH</i>	4	2	6
<i>ccmp2</i>	3	2	5
All loci	8	6	14

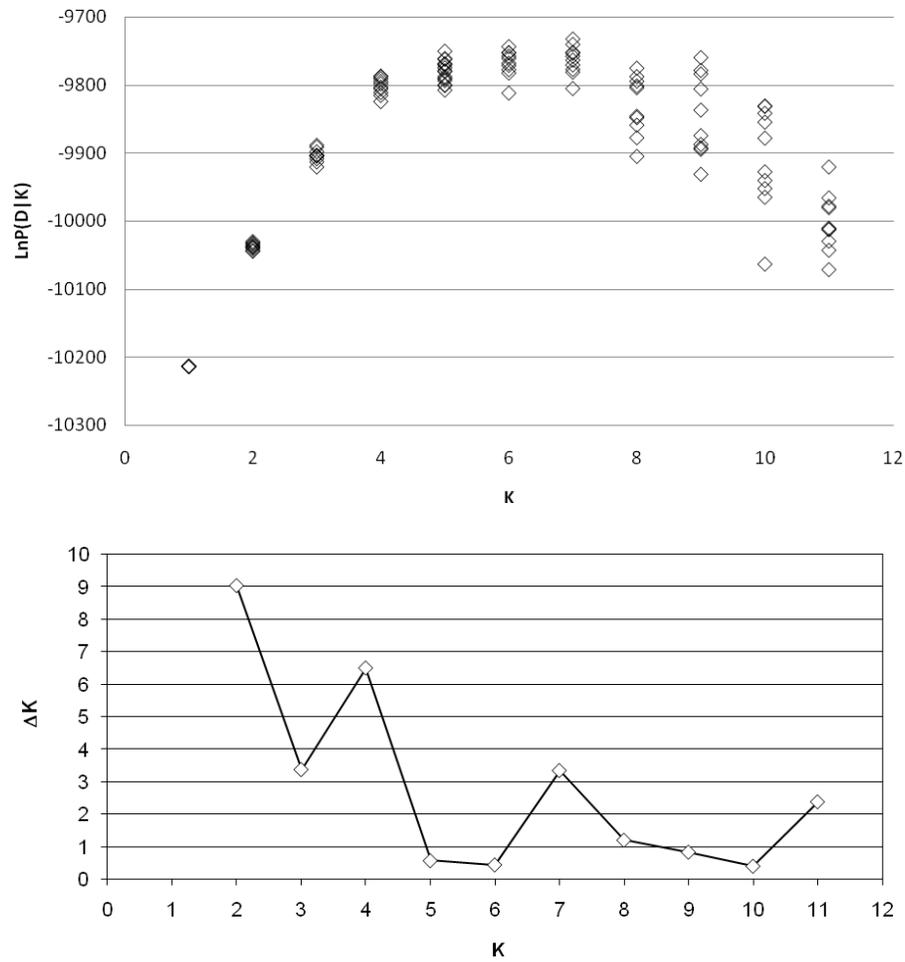


Figure S1. Posterior Log likelihood of data given K clusters (above) using the admixture model with correlated allele frequencies in STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) on the entire nuSSR data set (Upper and Lower Guinea) of *Milicia excelsa* and application of the *ad hoc* method by Evanno et al. (2005, below) to identify K . Burnin and run lengths in STRUCTURE were 100,000 iterations each. The Log likelihood of data does not show a clear maximum, but the method by Evanno indicates two peaks, suggesting $K = 2$ and $K = 4$ as best describing the genetic structure of the data.

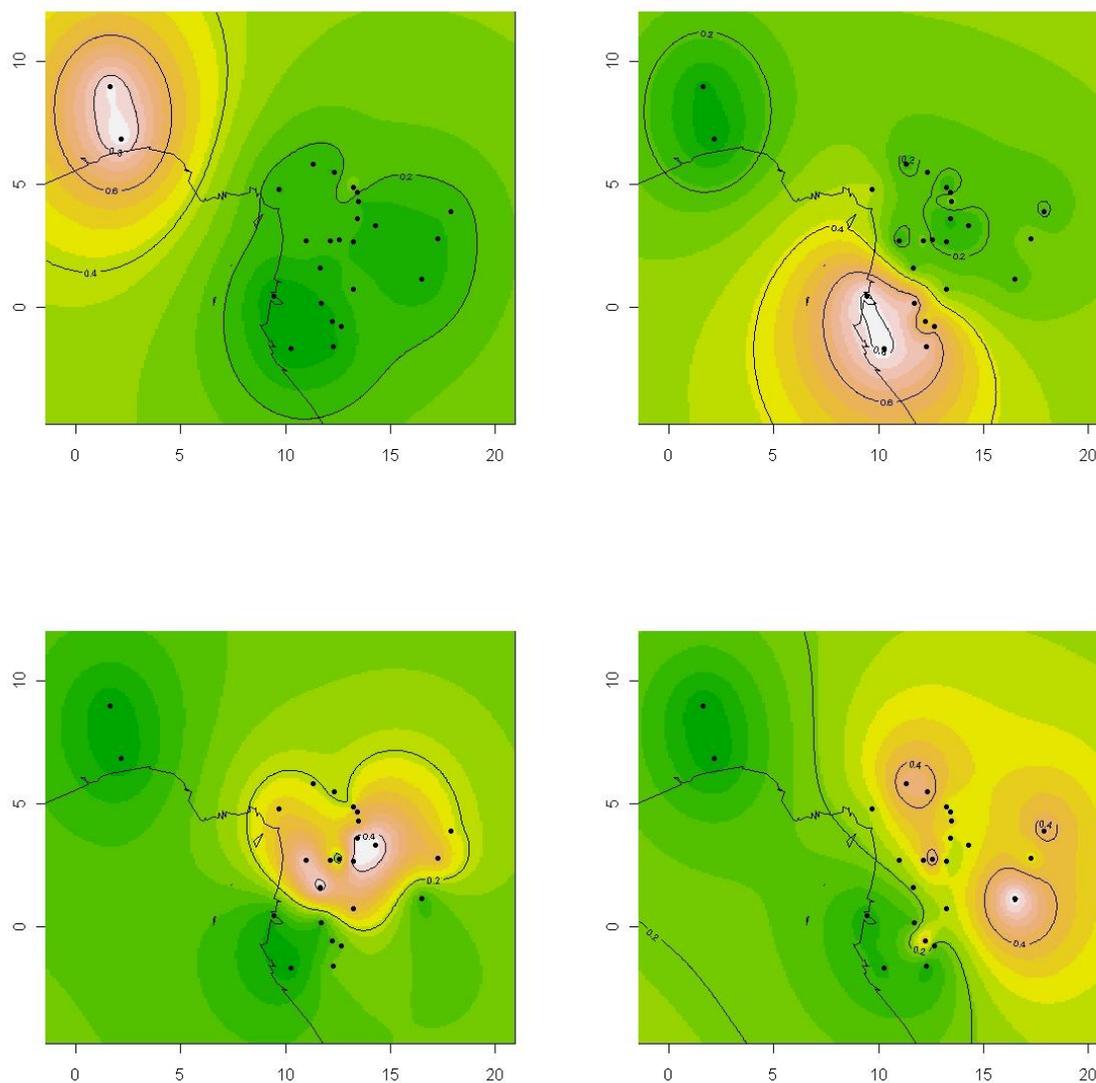


Figure S2. STRUCTURE results for $K=4$ obtained from 10 runs on the entire nuSSR data set (Upper and Lower Guinea) of *Milicia excelsa*, compiled using CLUMPP (Jakobsen & Rosenberg 2007) and displayed using the spatial interpolation method of Olivier François (http://www-timc.imag.fr/Olivier.Francois/admix_display.html) on the Q-matrix of populations. Each of $K = 4$ clusters is displayed in a separate graph, the white areas indicating maximal cluster membership. The populations from western Gabon (Libreville, Ekarlong) were assigned to a geographically localized cluster whereas the two remaining clusters in Lower Guinea had wider distributions.

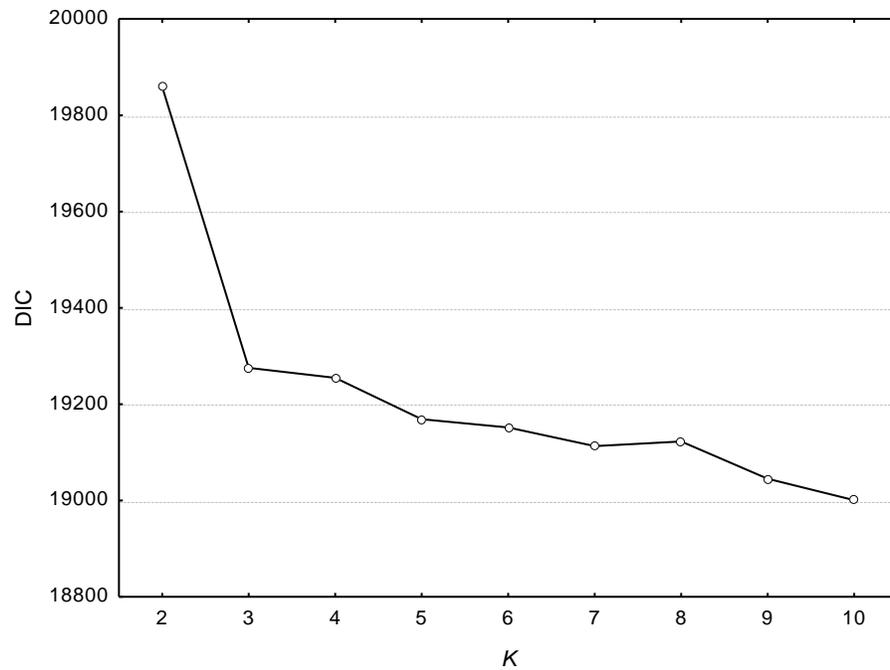


Figure S3. Determination of the number of clusters in the nuSSR data set of *Milicia excelsa* using the deviance information criterion (DIC) of results from the TESS program (Chen et al. 2007) obtained under the admixture model with interaction parameter $\psi = 0.3$ and a linear trend degree surface. A decrease in DIC is considered significant if it is of the order of at least 50; DIC is close to the asymptote indicates the best K. For our data, DIC values for $K = 2$ are significantly different from all the others (Post hoc Newman-Keuls test, $p < 0.05$) and DIC values obtained for $K = 3$ to $K = 8$ are similar (Newman-Keuls test, $p > 0.05$). This suggests $K = 3$ best explains the genetic data.

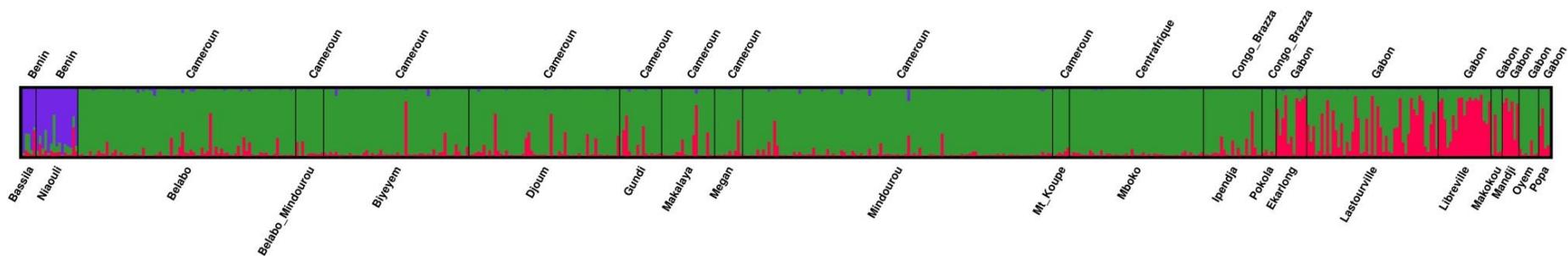


Figure S4. Proportions of individual ancestry for $K = 3$ genetic clusters using the admixture model with $\psi = 0.3$ and a linear trend degree surface in the TESS program. CLUMPP 1.1.1 (Jakobsson & Rosenberg 2007) was used to combine the ancestry proportions per individual from the 2% best results given by TESS and results were displayed using DISTRUCT 1.1 (Rosenberg 2004). Each individual is represented as a line segment which is vertically partitioned into K colored components representing the individual's estimated proportions of ancestry in the K clusters.

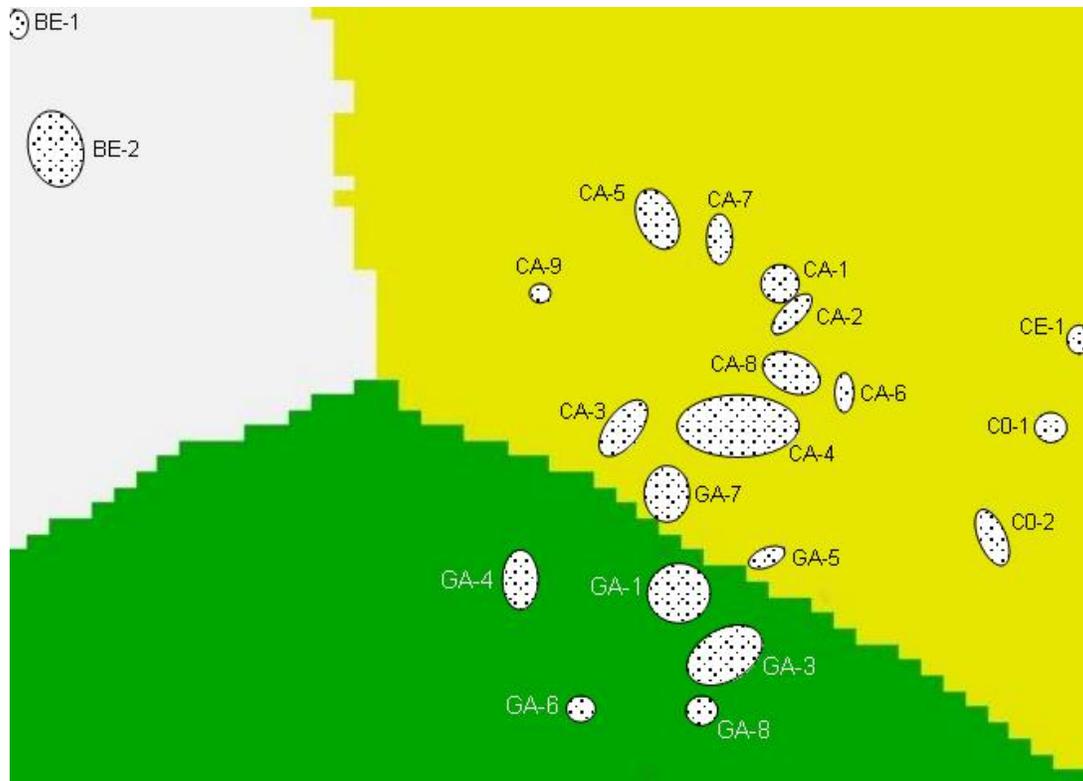


Figure S5. The result of the genetic clustering of 21 *Milicia excelsa* populations from Benin, Cameroon, Central African Republic, Republic of the Congo and Gabon, revealed by the GENELAND program. The uncorrelated allele frequencies model of this program identified three clusters displayed in three different colours: Clusters “Grey, Yellow and Green” correspond respectively to Clusters 1, 2 and 3 from TESS. Note that the Gabonese populations GA-3 and GA-8 were assigned to Cluster 3 by the TESS program.

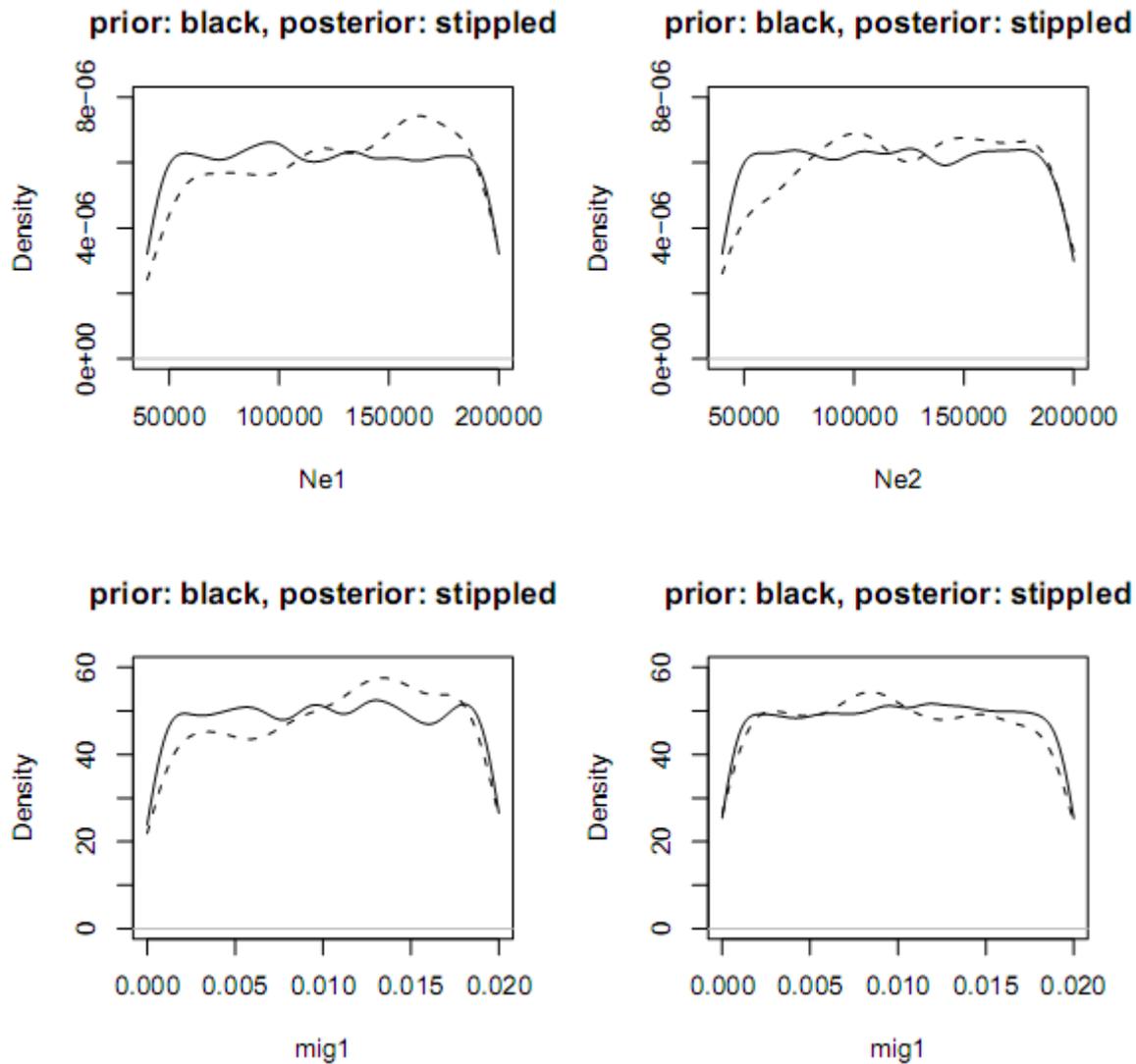


Figure S6. Prior and posterior density distributions of effective population sizes (N_e) and immigration rates (mig) into two diverging populations of *Milicia excelsa* from Lower Guinea, obtained from the popABC program (Lopes et al. 2009, see materials and methods). Population 1 corresponds to TESS cluster 1 centred on Cameroon, population 2 corresponds to TESS cluster 2 from western Gabon. The 1000 data sets retained for the posterior distributions correspond to the 1% simulated data sets that had summary statistics closest to the observed genetic data.

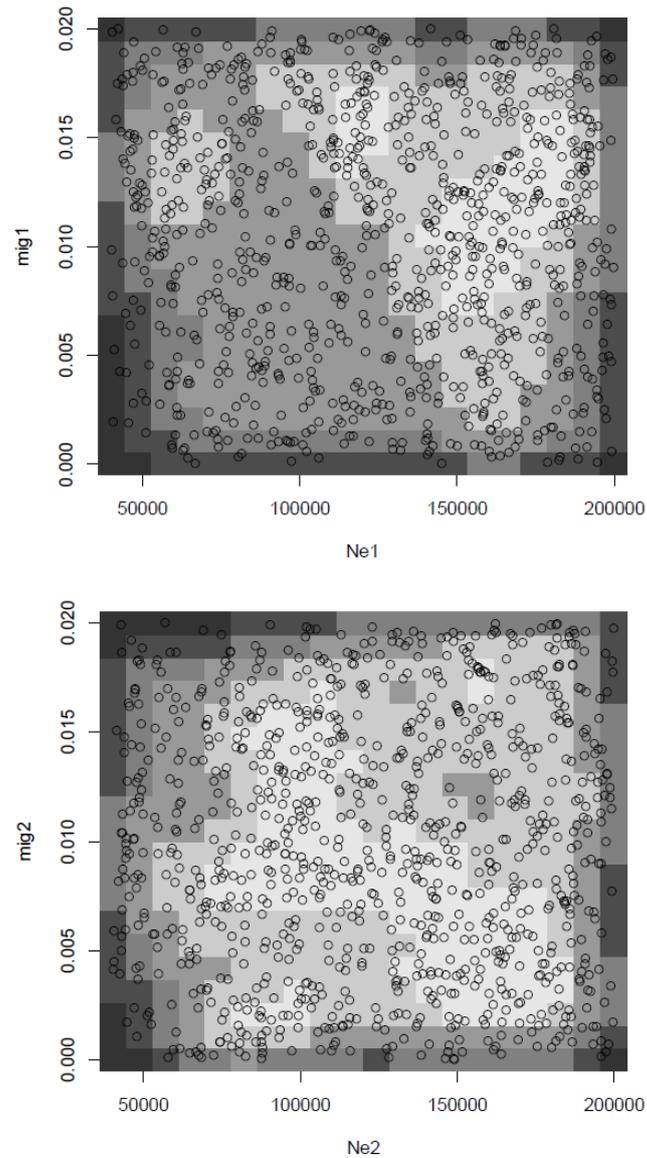


Figure S7. Posterior distributions of immigration rate ($mig1$, $mig2$) and population size ($Ne1$, $Ne2$) in TESS Cluster 2 centred on Cameroon (above) and in Cluster 3 from West Gabon (below). Circles correspond to data points and lighter shaded areas to larger density of the latter. Shading was obtained using the `kde2d` function of the MASS package in R (<http://www.r-project.org>). $Ne1$ of ca. 170,000 and $mig1$ of ca. 0.14 are best compatible whereas a wide range of values for $Ne2$ and $mig2$ show good compatibility with the observed data in *Milicia excelsa* (see Figure4 of the manuscript).

Text S1 Screening of cpDNA for polymorphism

Chloroplast DNA was screened for polymorphism in order to define suitable DNA regions for genetic analysis. Eight chloroplast DNA microsatellites (cpSSRs, namely ccmp1, ccmp2, ccmp3, ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp7 and ccmp10; Weising & Gardner 1999) were tested in 32 individuals selected throughout the study region using standard PCR reagents (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) and the PCR protocol of Weising & Gardner (1999). Ccmp1 and ccmp5 did not amplify. The remaining six loci were re-amplified using fluorescently labelled forward primers, and analysed and sized as above. CpSSRs were monomorphic except for ccmp2 (labelled with 6-FAM). Further screening for cpDNA polymorphism was done by sequencing six cpDNA regions suggested for plant barcoding, namely *trnH-psbA*, *rpl36-rps8*, *trnC-ycf6*, *trnL-F*, *rbcL* and *trnL-trnT(TabA-TabB)* (Kress et al. 2005 and references therein), in 16 individuals from different locations in Gabon and Cameroon. For *trnH-psbA* PCR reactions (25 µl) were conducted with the Phusion polymerase (Finnzymes) following the manufacturer's protocol using the accompanying HF buffer. For the remaining fragments, the PCR cocktail (25 µl) included 1X reaction buffer containing 1.5mM MgCl₂ (QIAGEN), 1 µl MgCl₂ at 25 mM to achieve a reaction concentration of 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.1 µM of each primer, 0.625 units Taq polymerase (QIAGEN) and 1 µl of DNA extract. Cycling conditions were: 94°C for 3 min, 35 cycles of 94°C for 20 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 1 min, followed by 72°C for 7 min and cooling to 10°C. PCR products were column-purified (QIAquick 96 PCR purification kit [QIAGEN] or MSB HTS PCRapace [Invitex, Berlin, Germany]) and sequenced following standard protocols using an ABI 3100 capillary sequencer (Applied Biosystems). Forward and reverse sequence trace files were merged and edited using the Staden package (<http://staden.sourceforge.net>). A site was considered a single nucleotide polymorphism (SNP) if different variants had at least a Phred quality value of 25, corresponding to an error probability of 3/1000. *trnH-psbA* and *trnC-ycf6* displayed one SNP each, *trnL-trnT(TabA-TabB)* displayed one SSR polymorphism and *rpl36-rps8*, *trnL-F* and *rbcL* were monomorphic.

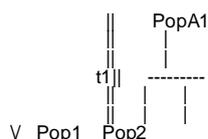
Text S2 Priors used in PopABC

Example of an input file for popABC with wide priors

```

1000 30 2 9
1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 1.00 0.25
m m m m m m m s
0
1 10 1e+06
1 10 1e+06
1 10 1e+06
1 10 1e+07
1 0 10
1 0 10
1 -3.3 0.5 0.5 0.5
1 -4.3 0.5 0.5 0.5
0
0
-----
PopABC - Mark Beaumont & Joao Lopes          01/05/09
>no_iterations, generation_time, no_populations, no_loci
>escalar per locus (autosome - 1; X-linked - 0.75; Y-linked or mitDNA - 0.25)
>type of DNA data (s - sequence; m - microsatellites)
>topology: 0 - uniform distribution;
           3 - uniform distribution (and choose a Model marker).
>ne1 params: 1 - uniform distribuion;
            2 - generalized gamma distribution.
>ne2 params
>neanc1 params
>t1 params: 1 - uniform distribuion;
            2 - generalized gamma distribution.
>mig1 params: 0 - zero migration;
              1 - uniform distribuion;
              2 - generalized gamma distribution;
              3 - uniform distribution (on number of migrations);
              4 - generalized gamma distribution (on number of migrations).
              [for 3 and 4 real mig rate is calculated as nmig/Ne]
>mig2 params
>mutM params: 0 - zero mutation;
              1 - lognormal distribution: (mean of mean(log10); stdev of mean(log10);
              mean of Sdev(log10); stdev of stdev(log10). Stdev truncated at 0.
              2 - normal distribution: (mean of mean; stdev of mean; mean of Sdev;
              stdev of stdev. Stdev truncated at 0.
>mutS params
>recM params: 0 - zero mutation;
              1 - lognormal distribution: (mean of mean(log10); stdev of mean(log10);
              mean of Sdev(log10); stdev of stdev(log10). Stdev truncated at 0.
              2 - normal distribution: (mean of mean; stdev of mean; mean of Sdev;
              stdev of stdev. Stdev truncated at 0.
>recS params
-----
Tree topology:

```



The first observation we made was that the simulated mutation rates were probably too high, since the large majority of simulated data sets showed much higher diversity than the observed data from *M. excelsa*, as shown in the figure below (Figure S2_1). We subsequently adjusted mutation rates to lower values.

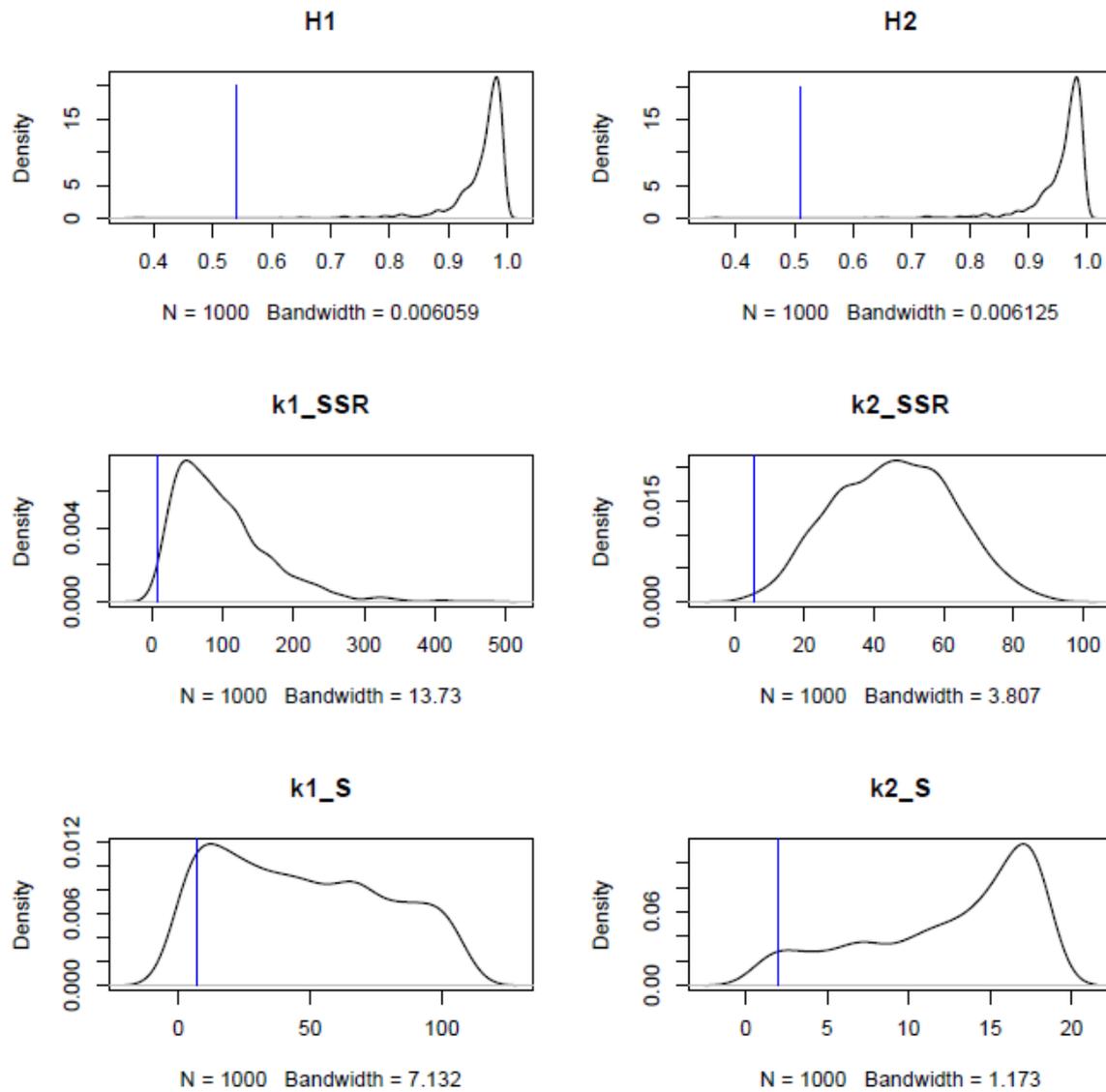


Figure S2_1 Distribution of some summary statistics from the data sets simulated under the priors described above and compared to the observed data from *M. excelsa* (blue vertical line). H1 and H2, gene diversity in populations 1 and 2; k1_SSR and k2_SSR, number of nuSSR alleles per locus in each population, k1_S and k2_S, number of haplotypes at the cpDNA sequence in both populations.

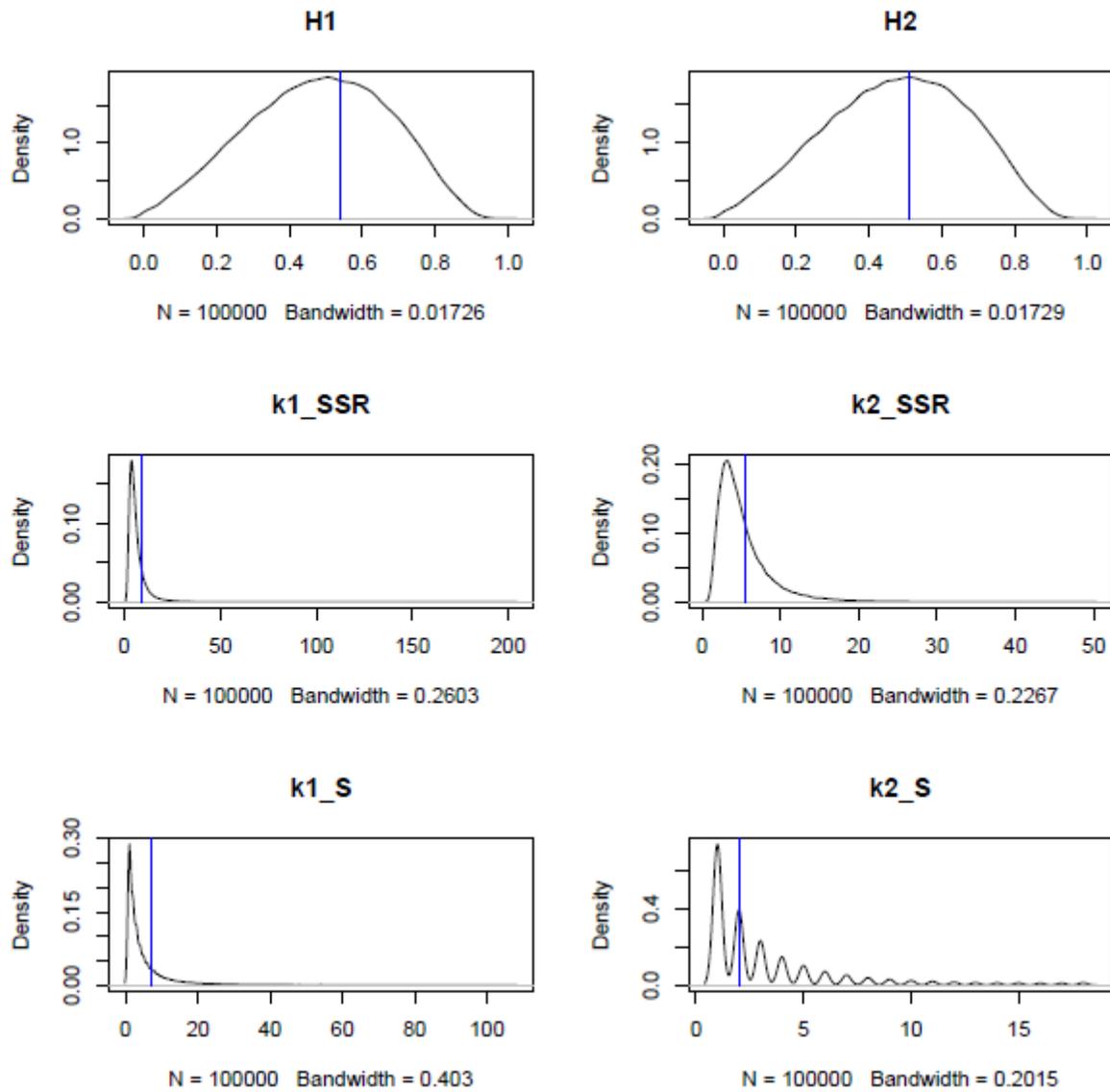


Figure S2_2 Distribution of some summary statistics from the data sets simulated under the adjusted (final) priors described above and compared to the observed data from *M. excelsa* (blue vertical line). H1 and H2, gene diversity in populations 1 and 2; k1_SSR and k2SSR, number of nuSSR alleles per locus in each population, k1_S and k2_S, number of haplotypes at the cpDNA sequence in both populations.

References

Chen C., Durand E., Forbes F., François O. (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: A new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 747-756.

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

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23**, 1801-1806.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.

Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 137-138

Annexe 3. Analyse de la banque de graines du sol de la zone d'étude (Article paru dans *Ecological Engineering*)

Ecological Engineering 37 (2011) 1499–1506



Contents lists available at ScienceDirect

Ecological Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoleng

Soil seed bank characteristics in Cameroonian rainforests and implications for post-logging forest recovery

Kasso Daïnou^{a,*}, Aline Bauduin^a, Nils Bourland^a, Jean-François Gillet^a,
Fousséni Fétéké^{a,b}, Jean-Louis Doucet^a

^a Laboratory of Tropical and Subtropical Forestry, Unit of Forest and Nature Management, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege, 2 Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgium

^b Pallisco SARL, Avenue des cocotiers 478, BP 394 Douala, Cameroon

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2010
Received in revised form 11 April 2011
Accepted 9 May 2011
Available online 8 June 2011

Keywords:

Soil seed bank
Central African rainforest
Forest disturbance
Pioneer species
Climax species
Forest resilience

ABSTRACT

The soil seed bank is considered as an important component for resilience of climatic vegetation. Whereas several related studies have been conducted in Asian, American and some African tropical forests, no investigation has ever been conducted in Central African rainforests, especially in logged forests where the soil seed bank could contribute to regeneration of timber of trees species. We studied the soil seed bank characteristics in relation to the standing vegetation in three Cameroonian forest zones with different disturbance regimes. There was no significant difference between sites in terms of density of the seed bank; the average mean density was 87.6 seeds m⁻². But dissimilarities of the floristic compositions between sites were quite high. Overall, seeds came from 43 species including three commercial tree species. Whereas the seedlings emerging from soil samples mostly came from weedy and short-lived pioneer species, climax species predominated in the extant vegetation, leading to a very weak similarity between soil seed flora and the surrounding vegetation: Sorensen's index ranged from 3.5 to 7.6%. Canopy openness could significantly affect the species richness of soil seed stocks but not the seed density. These results show that the soil seed bank contribution to the resilience of mature tropical forests is low. In particular, very few timber tree species could benefit from soil seed stocks for their regeneration. Therefore, the development of enrichment techniques including use of the soil seed bank as a source of tree regeneration in such a context would be irrelevant.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since Symington (1933) found a large quantity of seeds in Malaysian forest soil and as seed rain seems to account for only a small proportion of forest regeneration in disturbed zones (Putz and Appanah, 1987; Lawton and Putz, 1988), the importance of seed banks in vegetation dynamics is receiving increasing attention. Seed banks are a significant source of regeneration (Hosogi and Kameyama, 2006) and have been included in several restoration projects (Lemauiel et al., 2005; Williams et al., 2008) or weed control programs (Marks and Nwachuku, 2006).

A soil seed bank is defined as the number or store of viable seeds buried in the soil at a given time, representing a record of the recent vegetation of an area (Martins and Engel, 2007). Accord-

ing to Swaine and Whitmore (1988), seeds in the soil are of two kinds: (a) transient or ephemeral seeds, from species with very brief viability in forest soils (either they germinate quickly when water is available, or they die); (b) persistent seeds of species which have an extended viability in soil, and are commonly associated with the phenomenon of dormancy. However, various authors have emphasized the continuity between these two groups of species. Regarding tropical regions, Garwood (1989) defined three more soil seed bank strategies as intermediates to the two categories mentioned earlier.

Studies tend to show that persistent and pseudo-persistent seeds of weedy and short-lived pioneer species are the most commonly observed (Hopkins and Graham, 1983; Garwood, 1989; Dalling et al., 1998). Schmidt (2007) reported that many trees of humid tropical forests are animal-dispersed and rarely have post-dispersal seed dormancy; their seeds are adapted to rapid germination, even in shaded environments. Thus, seed banks in tropical forests, even in primary forests may be composed almost entirely of pioneers (*sensu* Swaine and Whitmore, 1988). In fact, several studies from tropical America (e.g., Ten Hoopen and Kapelle,

* Corresponding author at: Laboratory of Tropical and Subtropical Forestry, University of Liege, 2 Passage des Déportés, 5030 Gembloux, Belgium.
Tel.: +32 81622343; fax: +32 81622342.

E-mail addresses: kdainou@ulg.ac.be, kdainou@gmail.com (K. Daïnou).

2006; Dalling and Brown, 2009), Asia (e.g., Chandrashekara and Ramakrishnan, 1993; Metcalfe and Turner, 1998; Howlett and Davidson, 2003) and some parts of Africa (e.g., Keay, 1960; Hall and Swaine, 1980; De Villiers et al., 2003; Kassahun et al., 2009) have confirmed that the soil seed bank could be an important mechanism for the regeneration of only pioneer and secondary forest species (see also Garwood, 1989; Jankowska-Błaszczuk and Grubb, 2006).

Concerning the role of environmental patterns on seed bank characteristics, the effect of canopy disturbance on seed stocks in tropical forest soils has also been studied, but no clear trend can be seen. For instance, whereas Lindner (2009) found no relationship between canopy openness and seed bank characteristics, Perera (2005) revealed an influence of canopy openness on the species richness of the forest soil.

In the Congo Basin rainforests, many surveys of regeneration have been performed (Hall et al., 2003; Kouadio, 2009), but these studies have not been able to disentangle the relative contributions of seed rain and seed bank. In particular, in regard to logged African tropical forests, addressing the role of soil seed bank is relevant as it could be an interesting tool in forest management. Nowadays, national regulations for logging concessions in Central Africa recommend implementation of enrichment techniques with a significant cost (Doucet et al., 2009). Thus, beyond its contribution to the natural maintenance of biodiversity, a soil containing numerous seeds of timber trees could be implicated in forest enrichment in a number of ways. For example, as soil in logging gaps is generally compacted, repeated stirring of the soil could favor the emergence of commercial seedlings. Similarly, the transportation of seed-rich topsoil from an intact forest zone to nearby degraded lands could contribute to accelerate development of the appropriate vegetation (Skoglund, 1992). As most timber tree species are light-demanders (Doucet, 2003), their regeneration rates could be considerably improved with such techniques.

Up to now, no prior studies have documented soil seed bank characteristics and their possible relevance in Central African rainforests. Here, we investigated the potential of soil seed stocks in a Cameroonian forest concession, in relation with the main pattern of disturbance in this context: forest gaps made by cutting activities. We aimed to respond to the following questions:

- (1) What are the dominant life-forms in seed banks of Central African rainforests, and hence, what stages in forest succession could benefit from forest soil for their regeneration?
- (2) In order to promote regeneration of timber tree species through the potential of the soil seed bank, can forest soils be an important source of seedlings for these commercial species?
- (3) How are the seed bank characteristics affected by canopy disturbance patterns?

2. Materials and methods

2.1. Study sites

The study was conducted in a Cameroonian forest concession of 118,052 ha located at the west of the Dja Reserve and logged by the company Pallisco (Fig. 1). The concession has a mean elevation of about 650 m and extends between 3°01'–3°25'N and 14°05'–14°31'E in a mostly a semi-deciduous forest zone (Kouadio and Doucet, 2009). Rainfall is distributed in two rainy periods (from March to June, and from August to December) alternating with two dry seasons. The mean annual rainfall and temperature are respectively about 1550 mm and 24 °C (DMNC, 2009). Humidity is high throughout the year. The concession zone is a low fairly flat plateau

laid on a substratum of schists, gneisses and quartzite (Laclavère, 1979).

Three sites of late secondary forest with various logging histories were selected for the present study. The first stand of 8.25 ha, located in a protected forest area, *PF*, was never been exploited. The second site covered 4.80 ha and was located in a recently logged forest, *RLF*, where the most recent logging was performed two years ago. The third site was a 9-year-old logged forest, *OLF*, and covered 7.80 ha. Distances from one site to another varied from 10 to 20 km. These sites were fairly similar in species composition (Cerisier, 2009).

2.2. Soil sampling and seedling emergence test

Within each forest site, two or three transects were established with respect to the size of the site. The total length of transects was 300, 705 and 555 m for *RLF*, *OLF* and *PF*, respectively. Soil samples were collected every 15 m along the transects providing 21, 49 and 40 samples for *RLF*, *OLF* and *PF*, respectively. Each soil sample was a mixture obtained from three quadrats of 10 cm × 10 cm and 5 cm in depth established at the top of a 1 m-sided equilateral triangle. Large items of litter were removed before soil sampling. Thus, a total area of 3.3 m² and a total volume of 165,000 cm³ of soil were sampled. Since Mbarga et al. (1999) noted that November to March is the period of the lowest level of fruiting in South-Cameroonian rainforests, the samples were collected in February to limit seed rain inclusions.

Quantitative and qualitative composition of the seed banks was investigated using the seedling emergence method. Samples were sieved before the experiment began, in order to detect large and viable diaspores. The seedling emergence experiment was performed in a greenhouse at Gembloux Agro-Bio Tech (University of Liege), under average temperature and humidity of 25 °C and 60.5%, respectively. Each soil sample was spread to 1 cm depth onto a substrate of sterilized sandy loam in a tray. The containers were watered as required, at least once a day. They were also redistributed randomly inside the greenhouse each week. The seeds found during sieving were also put to germination in the same greenhouse. Each emergent seedling was removed and repotted for further growth until large enough for identification. The seedling emergence experiment was ended after 16 weeks, as all germination events occurred during the first 12 weeks.

2.3. Characterization of habitats

Canopy openness was estimated within each site, assuming that this parameter could affect soil seed bank characteristics. Canopy cover was estimated 1 m above the ground using a spherical densiometer. Densiometer measures were performed by the same person at each soil sampling point and under similar weather conditions. The spherical densiometer is known to be a good compromise between speed and accuracy as far as measurement of canopy cover is concerned (Korhonen et al., 2006). Moreover, this instrument is well adapted to estimate canopy closure which is defined as the fraction of non-visible sky within a certain angle of view whereas canopy cover is the fraction of ground area covered by crowns (Paletto and Tosi, 2009).

The extant vegetation of tree species with diameter at breast height (dbh) >10 cm was also surveyed up to 50 m each side of the transects on which soil sampling was performed. This inventory was performed to (a) verify the similarity in the woody flora between sites, and (b) compare its characteristics to those of the soil seed bank. In total, 3, 5.5 and 7.1 ha were surveyed in *RLF*, *OLF* and *PLF*, respectively.

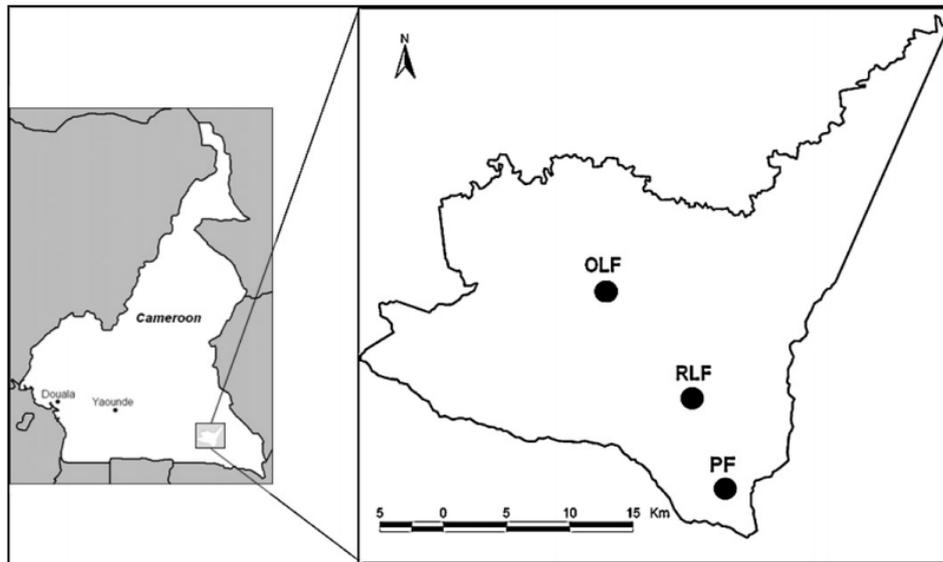


Fig. 1. Study sites in a Cameroonian logging concession. OLF: 9-year-old logged forest; RLF: recently logged forest; PF: protected forest area.

2.4. Data analyses

Hawthorne (1995) defined six regeneration guilds for tropical forest trees which were used here to categorize seeds in terms of light-requirements. The dispersal syndromes of the observed species were also mentioned as this information can help to understand the relationship between the soil flora and the surrounding vegetation. The existence of a significant correlation between species richness and density of seeds in the soil was investigated using Pearson's correlation coefficient. The following parameters were used to describe abundance of seeds: the absolute density AD (seeds m^{-2}), the relative density RD (%), number of seeds of a given species/the total number of seeds for all species) and the relative frequency RF (%), proportion of samples containing the given species) (Butler and Chazdon, 1998; Martins and Engel, 2007). To infer the α -diversity of the seed bank, two kinds of ecological indicators were computed using EstimateS 8.2.0 (Colwell, 2006): (i) observed species richness, S_{obs} , and (ii) estimates of total species richness, S_{chao2} and S_{ice} , following Chao (1984, 2005) and Lee and Chao (1994). These estimates are defined as follows:

$$S_{chao2} = S_{obs} + \left(\frac{Q_1^2}{2Q_2} \right)$$

$$S_{ice} = S_{freq} + \left(\frac{S_{infr}}{C_{ice}} \right) + \left(\frac{Q_1}{C_{ice}} \right) + \gamma_{ice}^2$$

where Q_1 is the number of species occurring in exactly one sample (unique), Q_2 is the number of species occurring in exactly two samples (duplicates), S_{freq} is the number of frequent species, that is, those found in more than 10 quadrats, S_{infr} is the number of infrequent species (found in 10 or fewer quadrats), C_{ice} is the sample incidence coverage estimator (Lee and Chao, 1994), and γ_{ice}^2 is the estimated coefficient of variation of the infrequent species. The assumption of these estimators is that the real species richness of a site is as higher as the number of rare and infrequent species increases. S_{chao2} and S_{ice} are among the least-biased species richness estimators; the former adapted to small numbers of samples (Colwell and Coddington, 1994; Chazdon et al., 1998; Walther and Moore, 2005).

The effect of age of disturbance oldness on the canopy openness was first tested with a Kruskal–Wallis analysis of variance (as the assumption of equal variances was not met even after variable transformation) followed by a Mann–Whitney U -Test where necessary. A test of homogeneity of slopes regression in ANCOVA was then performed to determine if differences existed between soil flora characteristics of sites with regards to canopy openness. Sites were treated as random effects and canopy openness as a covariate. To examine whether seeds of trees in the forest soil depends on the surrounding tree vegetation, the Sorensen's similarity index C_S was used at site level.

Similarity in the soil flora between sites was also determined by Sorensen's index. To compare abundance between sites, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed after a log transformation. However, as differences in the structure of the seed bank could be related to both species composition and abundance, data were ordinated by Principal Component Analysis (PCA) based on a covariance matrix and using STATISTICA 6.0 (StatSoft France, 2004).

3. Results

3.1. Seed bank characteristics

Throughout the experiment, a total of 289 seedlings was recorded from 3.3 m^2 of forest soil providing an average of 87.6 seeds m^{-2} . All seedlings emerged within the first 12 weeks. Seeds of 43 species germinated, including 17 herbaceous species (39.5%), 11 liana species (25.6%) and 15 shrub and tree species (34.9%), including three timber tree species: *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn., *Erythrophleum suaveolens* (Guill. & Perr.) Brenan and *Terminalia superba* Engl. & Diels. Only one taxon, *Strombosia pustulata* Oliv. can be considered as a climax species. Zoochory was the most prevalent dispersal syndrome in the soil flora: 58.1% of the seedlings come exclusively from animal-dispersed seeds whereas only 9.3% of the seeds in the soil are dispersed by wind and 7.0% by autochory. The rest of the represented plant species (25.6%) combine autochory and zoochory (Table 1).

There was a significant correlation between seed density and species richness of the soil flora in RLF (Pearson's $R=0.89$ and

Table 1

Composition of soil seed banks in three forest zones. Dispersal syndromes: Au = autochory, An = anemochory, Z = zoochory. AD = absolute density, RD = relative density and RF = relative frequency. Regarding species temperament, the following guilds were used (Hawthorne, 1995; J-L. Doucet, pers. comm.): SB = shade-bearer, P = pioneer and NPLD = non-pioneer light-demander. Underlined taxa are those specific to the considered site. The taxa are ordered according to their importance in terms of absolute density (AD).

Taxa	Family	Guild	Dispersal mode	AD (n/m ²)	RD (%)	RF (%)
Recently logged forest (RLF)						
Weedy species (5 species)						
<i>Digitaria horizontalis</i> Willd.	Poaceae	P	Au	12.7	28.5	33.3
<i>Piper</i> sp.	Piperaceae	P	Z	9.5	21.3	23.8
<i>Palisota hirsuta</i> (Thunb.) K. Schum.	Commelinaceae	P	Z	4.8	10.8	14.3
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Asteraceae	P	An	1.6	3.6	4.8
<i>Euphorbia hirta</i> L.	Euphorbiaceae	P	Au/Z	1.6	3.6	4.8
Lianas (4 species)						
<i>Ficus thonningii</i> Blume	Moraceae	P	Z	4.8	10.8	14.3
<i>Ficus calyprata</i> Thonn. ex Vahl	Moraceae	P	Z	1.6	3.6	4.8
<i>Ficus</i> sp.	Moraceae	P	Z	1.6	3.6	4.8
<i>Ficus craterostoma</i> Warb. ex Mildbr. & Burret	Moraceae	P	Z	1.6	3.6	4.8
Trees (3 species)						
<i>Erythrophleum suaveolens</i> (Guill. & Perr.) Brenan	Caesalpiniaceae	P	Au/Z	1.6	3.6	4.8
<i>Musanga cecropioides</i> R. Br.	Moraceae	P	Z	1.6	3.6	4.8
<i>Tetrorchidium didymostemon</i> (Baill.) Pax & K. Hoffm.	Euphorbiaceae	P	Au/Z	1.6	3.6	4.8
Total for RLF: 12 species, with 25% of specific taxa				41.3	100.0	
9-year-old logged forest (OLF)						
Weedy species (12 species)						
<i>Piper</i> sp.	Piperaceae	P	Z	71.4	61.4	55.1
<i>Palisota hirsuta</i> (Thunb.) K. Schum.	Commelinaceae	P	Z	6.8	5.8	16.3
<i>Palisota ambigua</i> (P. Beauv.) C.B. Clarke	Commelinaceae	P	Z	4.1	3.5	8.2
<i>Costus lucanusianus</i> J. Braun & K. Schum.	Zingiberaceae	P	Au/Z	4.1	3.5	8.2
<i>Bertiera bicarpellata</i> (K. Schum.) N. Hallé	Rubiaceae	P	Z	3.4	2.9	4.1
<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	Asteraceae	P	An	2.7	2.3	6.1
<i>Echinochloa colona</i> (L.) Link	Poaceae	P	Au	1.4	1.2	4.1
<i>Digitaria horizontalis</i> Willd.	Poaceae	P	Au	1.4	1.2	4.1
<i>Commelina diffusa</i> Burm.f.	Commelinaceae	P	Au/Z	0.7	0.6	2.0
<i>Datura</i> sp.	Solanaceae	P	Au/Z	0.7	0.6	2.0
<i>Haumania liebrechtsiana</i> (De Wild. & T. Durand) J. Léonard	Marantaceae	P	Z	0.7	0.6	2.0
<i>Phyllanthus amarus</i> Schumacher & Thonn.	Euphorbiaceae	P	Z	0.7	0.6	2.0
Lianas (4 species)						
<i>Urera cameroonensis</i> Wedd.	Urticaceae	P	Au/Z	2.0	1.8	4.1
<i>Cissus</i> sp.	Vitaceae	P	Z	0.7	0.6	2.0
<i>Ficus elasticoides</i> De Wild.	Moraceae	P	Z	0.7	0.6	2.0
<i>Phyllanthus muellerianus</i> (Kuntze) Exell	Euphorbiaceae	P	Z	0.7	0.6	2.0
Trees and shrubs (8 species)						
<i>Musanga cecropioides</i> R. Br.	Moraceae	P	Z	3.4	2.9	8.2
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume	Ulmaceae	P	Z	3.4	2.9	8.2
<i>Terminalia superba</i> Engl. & Diels	Combretaceae	P	An	2.7	2.3	8.2
<i>Citrus</i> sp.	Rutaceae	P	Z	1.4	1.2	4.1
<i>Strombosia pustulata</i> Oliv.	Oleaceae	SB	Z	1.4	1.2	4.1
<i>Macaranga barteri</i> Müll.Arg.	Euphorbiaceae	P	Au/Z	0.7	0.6	2.0
<i>Margaritaria discoidea</i> (Baill.) G.L. Webster	Euphorbiaceae	P	Au/Z	0.7	0.6	2.0
<i>Xylopi aethiopica</i> (Dunal) A.Rich.	Annonaceae	P	Z	0.7	0.6	2.0
Total for OLF: 24 species, with 50% of specific taxa				116.3	100.0	
Protected forest (PF)						
Weedy species (10 species)						
<i>Palisota hirsuta</i> (Thunb.) K. Schum.	Commelinaceae	P	Z	5.8	7.6	12.5
<i>Melastomataceae</i>	Melastomataceae	-	-	2.5	3.3	5
<i>Piper</i> sp.	Piperaceae	P	Z	2.5	3.3	7.5
<i>Palisota ambigua</i> (P. Beauv.) C.B. Clarke	Commelinaceae	P	Z	1.7	2.2	5
<i>Costus lucanusianus</i> J. Braun & K. Schum.	Zingiberaceae	P	Au/Z	1.7	2.2	5
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Asteraceae	P	An	0.8	1.1	2.5
<i>Commelinaceae</i>	Commelinaceae	-	-	0.8	1.1	2.5
<i>Euphorbia hirta</i> L.	Euphorbiaceae	P	Au/Z	0.8	1.1	2.5
<i>Impatiens</i> sp.	Balsaminaceae	-	-	0.8	1.1	2.5
<i>Bertiera bicarpellata</i> (K. Schum.) N. Hallé	Rubiaceae	P	Z	0.8	1.1	2.5
Lianas (7 species)						
<i>Ficus thonningii</i> Blume	Moraceae	P	Z	10.0	13.0	7.5
<i>Ficus elasticoides</i> De Wild.	Moraceae	P	Z	9.2	12.0	17.5
<i>Ficus wildemaniana</i> Warb.	Moraceae	P	Z	7.5	9.8	12.5
<i>Ficus calyprata</i> Thonn. ex Vahl	Moraceae	P	Z	5.8	7.6	5
<i>Cissus dinklagei</i> Gilg & M. Brandt	Vitaceae	P	Z	0.8	1.1	2.5
<i>Ficus barteri</i> Sprague	Moraceae	P	Z	0.8	1.1	2.5
<i>Phyllanthus muellerianus</i> (Kuntze) Exell	Euphorbiaceae	P	Z	0.8	1.1	2.5
Trees (9 species)						
<i>Margaritaria discoidea</i> (Baill.) G.L. Webster	Euphorbiaceae	P	Au/Z	13.3	17.4	10
<i>Zanthoxylum lepreurii</i> Guill. & Perr.	Rutaceae	P	Z	2.5	3.3	7.5
<i>Macaranga monandra</i> Müll.Arg.	Euphorbiaceae	P	Au/Z	0.8	1.1	2.5
<i>Tabernaemontana crassa</i> Benth.	Apocynaceae	SB	Z	1.7	2.2	5

Table 1 (Continued)

Taxa	Family	Guild	Dispersal mode	AD (n/m ²)	RD (%)	RF (%)
<i>Celtis adolfi-friderici</i> Engl.	Ulmaceae	NPLD	Z	1.7	2.2	5
<i>Macaranga barteri</i> Müll.Arg.	Euphorbiaceae	P	Au/Z	0.8	1.1	2.5
<i>Terminalia superba</i> Engl. & Diels	Combretaceae	P	An	0.8	1.1	2.5
<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Bombacaceae	P	An	0.8	1.1	2.5
<i>Erythrophleum suaveolens</i> (Guill. & Perr.) Brenan	Caesalpinaceae	P	Au/Z	0.8	1.1	2.5
Total for PF: 26 species, with 42% of specific taxa				76.7	100.0	

Table 2

Species richness (observed S_{obs} , predicted number of species by S_{chao2} and S_{ice}) and similarity (C_s) between soil seed banks of the three sites: RLF = recently logged forest, OLF = 9-year-old logged forest, PF = protected forest. SD = standard deviation.

Sites	S_{obs}	S_{chao2} (SD)	S_{ice} (SD)	C_s (%)		
				RLF	OLF	PF
RLF	12	38.7 (20.3)	28.1 (0.0)	–	22	37
OLF	24	32.3 (6.9)	34.3 (0.1)	–	–	40
PF	26	36.3 (7.8)	38.9 (0.0)	–	–	–

$p < 0.001$). Mean density in RLF was 41.3 seeds m⁻². Seedlings germinated from 12 species, but estimates of species richness were higher and not congruent ($S_{ice} = 28.1$ and $S_{chao2} = 38.7$ species; Table 2). Thus only 31.0–42.7% of the predicted species richness was revealed. This means that the seed bank in this zone is considerably heterogeneous from one sample to another, and rare and infrequent species are numerous. Most of the seedlings were from weedy and lianas species (Table 1; total RD for herbaceous and lianas = 89.2%), with a high occurrence of the taxa *Digitaria* and *Piper*. Only three tree species were found in RLF and they were pioneers: *E. suaveolens* (a timber tree), *Musanga cecropioides* R. Br. and *Tetrorchidium didymostemon* (Baill.) Pax & K. Hoffm.

The soil in OLF displayed a density of 116.3 seeds m⁻² and 24 species (S_{obs} in Table 1). This richness should account for 70 or 75% of the most likely value of species richness as $S_{ice} = 34.3$ and $S_{chao2} = 32.3$ species (Table 2). Seed density and species richness were correlated (Pearson's $R = 0.39$ and $p = 0.005$). An important proportion of weedy species was also observed: 50%. More than 61% of the total density in this zone was provided by seeds of the taxon *Piper*, and weedy species accounted for 84.1% of the total number of seeds. Excluding *S. pustulata*, all trees and shrubs found in OLF soil were pioneers or non-pioneer light demanders.

The protected zone PF displayed 26 species (Table 1). This value was about of 67–72% of the predicted species richness according to S_{chao2} and S_{ice} (Table 2). Seed density was intermediate to the other sites: 76.7 seeds m⁻² (Table 1), and was significantly correlated to species richness (Pearson's $R = 0.70$ and $p < 0.001$). Although this site showed a similar number of tree species as OLF, several species, such as *Celtis adolfi-friderici* Engl., *C. pentandra* and *Tabernaemontana crassa* Benth. were specific to the soil of PF. By contrast to the other zones, *Piper* was less abundant here (RD = 3.26%) and appeared only in 7.5% of the samples (Table 1).

3.2. Similarity of seed banks between sites

There was no significant difference in terms of density between sites (ANOVA; $F_{2,107} = 2.44$; $p = 0.091$). Regarding floristic composition, specificity in each zone reached 25–50% of emerged species (Table 1). Similarity indices between the seed banks of the three sites were fairly low and never exceeded $C_s = 40\%$ (Table 2). The PCA ordination analysis of the seed banks from the three sites revealed no clear structure, even after removal of the most common taxon from the data set: *Piper* (Fig. 2). The two first axes explained 53.2% of the total variance and were largely determined by the taxon *Margaritaria discoidea* (Baill.) G.L. Webster, which is absent in RLF, and *Ficus thonningii* Blume, which was not found in the soil samples from OLF.

garitaria discoidea (Baill.) G.L. Webster, which is absent in RLF, and *Ficus thonningii* Blume, which was not found in the soil samples from OLF.

3.3. Influence of environmental characteristics

Forest canopy closure was significantly different between sites (Kruskal–Wallis ANOVA; $H = 10.22$, $p = 0.006$). Its value was 6% lower in the recently logged forest than in the two other sites (Fig. 3). Canopy closure could significantly affect α -diversity of the soil seed bank (ANCOVA, $F_{1,104} = 13.75$ and $p = 0.002$) whereas neither site nor interaction between site and canopy openness had a significant effect on the species richness of the forest soil (ANCOVA, $p > 0.05$). Seed density at sample level was not significantly affected by canopy closure, site or their interaction (ANCOVA, $p > 0.05$).

Floristic composition of the three forest stands did not display important differences as C_s ranged from 74% to 81% (Table 3). S_{obs} ranged from 110 to 143 species and the estimates of S_{chao2} showed that S_{obs} corresponded to 89%, 72% and 69% of the total richness of RLF, OLF and PF respectively. Shade-bearer and non-pioneer light-demanders are the most prevalent taxa in the woody vegetation (Table 3). Overall, the soil seed bank and the standing tree vegetation shared only 10 tree species: the light-demanding pioneer species *M. cecropioides*, *Trema orientalis* (L.) Blume, *T. superba*, *E. suaveolens*, *Tetrorchidium didymostemon*, *C. pentandra* and *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich; the shade-tolerant species *S. pustulata* and *T. crassa*, and the non-pioneer light demander *Celtis adolfi-friderici*. Therefore, the value of C_s between the standing tree vegetation and the soil seed bank in each site was very low: 3.5%, 7.6% and 6.5% in RLF, OLF and PF respectively.

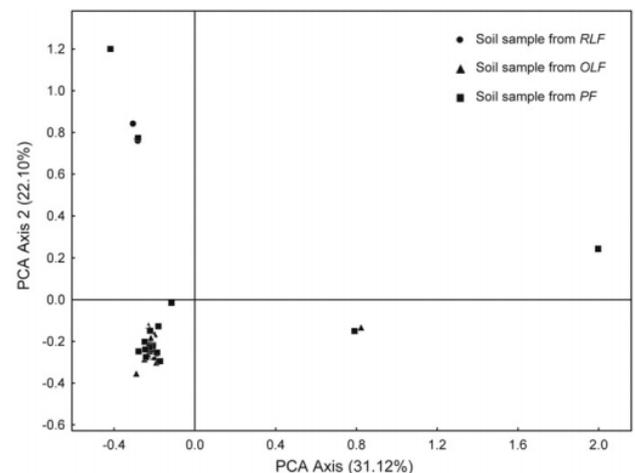


Fig. 2. Ordination diagram based on principal component analysis of seed bank abundance and species composition; the taxon *Piper* was removed from the analyzed data set since it was well distributed in all of the sites. Eigen1 = 1.97, Eigen2 = 1.40. The first axis was mainly determined by abundance of *Margaritaria discoidea* (99.8% of contribution) whereas the second axis separated samples according to *Ficus thonningii* abundance (99.4% of contribution).

Table 3

Some characteristics of the standing vegetation (trees with dbh ≥ 10 cm) in the three sites: *RLF* is a 2-year-old logged forest (or recently logged forest), *OLF* is a 9-year-old logged forest and *PF* is a protected forest. The guilds were named following Hawthorne (1995): NPLD = non-pioneer light-demander, P = pioneer, SB = shade-bearer, 'unknown' group taxa whose temperament is not well established. For other characteristics: *AD* = absolute density, S_{obs} = number of observed species, S_{chao2} = predicted number of species after Chao (1984, 2005), C_s is the Sorensen's similarity index.

Guilds	Guilds abundance		Additional characteristics of the standing vegetation			C_s (%)			The most prevalent taxa per site
	Percentage of species (%)	RD (%)	<i>AD</i> (n/ha)	S_{obs}	S_{chao2}	<i>RLF</i>	<i>OLF</i>	<i>PF</i>	
<i>RLF</i>									
NPLD	20.0	14.2	98.3	110	124	–	81.0	74.3	<i>Desbordesia glaucescens</i> – <i>Tabernaemontana crassa</i> – <i>Greenwayodendron suaveolens</i> – <i>Trichilia welwitschii</i> – <i>Trichilia dregeana</i> – <i>Pericopsis elata</i> – <i>Celtis adolfi-friderici</i>
P	26.4	9.6							
SB	46.3	70.5							
Unknown	7.3	5.7							
<i>OLF</i>									
NPLD	17.9	12.8	98.0	123	170	–	–	77.8	<i>Trichilia dregeana</i> – <i>Strombosia pustulata</i> – <i>Drypetes</i> sp. – <i>Diospyros</i> sp. – <i>Duboscia macrocarpa</i> – <i>Corynanthe pachyceras</i> – <i>Diospyros canaliculata</i>
P	30.1	14.7							
SB	44.7	65.3							
Unknown	7.3	7.3							
<i>PF</i>									
NPLD	23.6	18.4	135.4	143	208	–	–	–	<i>Greenwayodendron suaveolens</i> – <i>Duboscia macrocarpa</i> – <i>Pausinystalia macroceras</i> – <i>Desbordesia glaucescens</i> – <i>Hannoa klaineana</i> – <i>Anonidium mannii</i> – <i>Funtumia elastica</i>
P	24.5	7.9							
SB	46.9	70.0							
Unknown	10.5	3.7							

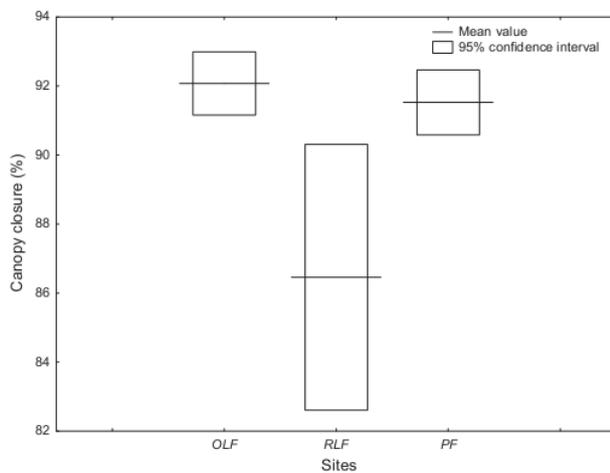


Fig. 3. Average forest canopy closure of the three study sites in a Cameroonian logging concession. *OLF*: 9-year-old logged forest, *RLF*: recently logged forest, *PF*: protected forest.

4. Discussion

Our data provide the first estimate of seed bank characteristics from a Central African rainforest. As we collected soil samples during the period of low tree fruiting activity and we did not include litter component in our sampling, seed rain inclusion should be negligible. However, we suspect that seeds of *T. crassa* came from seed rain as they are non-dormant (Dollet and Dubern, 1977).

4.1. Contribution of the soil seed bank in forest restoration and for the regeneration of timber trees species

By definition, the soil seed bank is supplied with dormant seeds and dormancy is commonly related to seed size (Venable and Brown, 1988). From the Neotropics, Uasuf et al. (2009) assessed seeds of several woody species and concluded that they were large

with high moisture content; indicative of adaptation to immediate germination. In the present study, herbaceous species that are typical of disturbed habitats constituted the most prevalent life-forms emerging from forest soils. Their predominance in soil seed banks can be explained by a combination of several factors. These herbaceous plants generally produce large amounts of small seeds which are less likely to be predated on or damaged by micro-organisms than large seeds of perennial tree species (Janzen, 1988). Also, small diaspores from weedy and pioneer shrub and tree species tend to germinate more slowly than larger ones (Hall and Swaine, 1980; Tweddle et al., 2003). Several studies have demonstrated that seeds of pioneer and early secondary species can survive many years in the forest soil: 2–30 years according to Hopkins and Graham (1987), Dalling et al. (1997), Floyd (1990) and Dalling and Brown (2009). In this study, shade-bearers were very rare in the soil seed banks (only *S. pustulata* is represented) although they presented a high abundance in the extant tree vegetation. Liew (1973), Hall and Swaine (1980) and Hopkins and Graham (1983) also observed that climax species account for only 12–21% of species richness in soil stocks.

The forest soil appears to not contribute largely to the regeneration of timber trees species. In our case, (i) only three timber species were represented in the forest soil, (ii) these species were at very low density (*AD* never exceeded 2.7 seeds m^{-2}) and (iii) they were found in less than 9% of the collected samples. In West Africa, Hall and Swaine (1980) also observed very low amounts of seeds from commercial tree species in the forest soil (from only four species out of 90). Clearly, the forest soil could not provide a good supply of diaspores of commercial trees, although some important species may be favored: *C. pentandra*, *Erythrophleum* spp. and *Terminalia* spp. Thus no efficient strategy can include the use of forest soil as far as the enrichment of degraded lands with commercial species is concerned. For such purpose, planting in logging gaps with seedlings coming from tree nursery should be more efficient (Doucet et al., 2009).

The low values of similarity indices between the seed bank and the mature vegetation provided more proof of the weak contribution of soil seed stocks to mature stands. Hall and Swaine (1980) found coefficients of similarity between forest soil and vegetation ranging from 0 to 9% (using Jaccard's coefficient). Similar

conclusions were made from other studies (Perera, 2005; Uasuf et al., 2009). Dispersal syndromes cannot explain this dissimilarity since zoochory was prevalent in both floristic components. Finally, Baskin and Baskin (2003) and Schmidt (2007) were probably right when they noted that trees of the humid tropical forests rarely have post-dispersal seed dormancy.

As shown by Russel-Smith and Setterfield (2006), the present results also suggest that seed rain may play a more important role than soil seed stocks in tree species regeneration in mature tropical rainforests. However, the role of the soil seed bank in forest recruitment is still debatable because many other studies have shown its contribution to tree regeneration. Disturbance is very important for regeneration of tropical forests, and the extent, type and the timing of disturbance may fundamentally determine the species response, regardless of seed sources (Denslow, 1980). Under this hypothesis, the local contribution of the seed bank to the standing vegetation can vary greatly between sites.

4.2. Heterogeneity in density and species composition of the soil seed bank

A large proportion of seed bank studies conducted in tropical zones confirm the spatial heterogeneity of soil seed bank characteristics (Hall and Swaine, 1980; Perera, 2005; Uasuf et al., 2009). The absence of partitioning in the PCA analysis highlights an important heterogeneity between sites as well as within sites. Variation in canopy closure can partially explain this heterogeneity (Leckie et al., 2000; Isselin-Noddedeu and Bédécarrats, 2007). Martins and Engel (2007) showed that reduced canopy closure in a forest zone can induce a slight increase in seed bank density and species richness whereas Lindner (2009) found no relationship between canopy openness and seed bank characteristics. Although we demonstrated a possible link between canopy closure and species richness, this requires further investigation.

In the present study, seed densities in the forest soil ranged from 41 to 116 seeds m^{-2} . In general, seed density tends to be lower in upland evergreen forests and wet evergreen forests than in more disturbed ones (Aubréville, 1947; Keay, 1960; Alexandre, 1978; Hall and Swaine, 1980). According to Garwood (1989), seed density in tropical forests is broadly variable and ranges from 25 to 3350 seeds m^{-2} . This huge variation might also be due to diversity in methods of seed bank characterization (Warr et al., 1993). Although our data were consistent with previous studies they may be considered as conservative since the number of emerged seedlings may have been underestimated as a result of the experimental conditions: (i) some small seeds could fail to germinate because they were too deeply covered by soil and (ii) quiescent species (which just need an environmental factor to germinate; Baskin and Baskin, 2003) should germinate within a few weeks, but this may not be the case for the dormant ones which can persist in the soil for a long time.

Regarding species richness of the soil flora, the values of S_{obs} found here lie within the range of data collected from West African forest soils: 11–43 species according to Hall and Swaine (1980) and Keay (1960). Although most related studies provide only S_{obs} , Walther and Moore (2005) confirmed that the use of any estimator is preferable to a simple species count, unless sampling has been exhaustive. When analyzing values of observed and predicted species richness, Butler and Chazdon (1998) and Garcia (1995) showed that S_{obs} generally accounts for 70–85% of the predicted species richness of tropical forest soils. Despite a significant sampling effort in RLF in relation to the size of the site, this threshold was not reached, suggesting that the recent disturbance could have influenced the species richness and the heterogeneity of the forest soil flora.

5. Conclusions

Patterns of forest soil seed bank in Cameroon are similar to those in West African rainforests. Our results indicate an important spatial variation in soil seed bank characteristics between sites despite a pronounced similarity in standing tree vegetation in different sites. As noted in other tropical rainforest sites, the soil seed bank is dominated by weedy and short-lived pioneer species which are light-demanders and could only emerge under adequate conditions, that is, in forest gaps. Thus, the contribution that soil seed stocks make to logged forest recovery may be notable in early stages of forest succession. Accordingly, very few timber tree species can benefit from soil seed stocks for their regeneration and therefore no opportune enrichment technique should be proposed in the context of tropical humid forests. For the light-demanding commercial species, planting in logging gaps may be a more efficient way to perpetuate their populations in these ecosystems. This work is the first attempt towards characterizing soil seed banks in a Central African rainforest. Further studies are needed to investigate the role of soil seed banks in forest regeneration, regarding burial conditions, topographic position and soil properties.

Acknowledgements

Financial support for this research was provided by Gembloux Agro-Bio Tech of the University of Liege (project PPR 10000 TROP-DIV), the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS) through grants FRFC No. 2.4576.07 and the abbey Notre-Dame de Scourmont (Chimay, Belgium). We are indebted to the forest company Pallisco (Cameroon), the NGO Nature Plus and Gembloux Agro-Bio Tech for logistic support and technical assistance. We are especially grateful to Gregory Mahy, Luc Bolyn, Michel Rougeron, Loïc Douaud, Robert Haentjens, Michèle Federspiel, Jean-Yves Devleeschouwer, Théophile Ayol, Emerand Gassang, Crépin Djopandé, Paul Zok and Ismaila Nana for their various contributions. We thank Nikki Tagg, Fabien Hountondji and Zandile Blackett for their constructive comments and for assistance with editing the manuscript.

References

- Alexandre, D.Y., 1978. Observations sur l'écologie de *Trema guineensis* en basse Côte d'Ivoire. Cah. ORSTOM 13, 261–266.
- Aubréville, A., 1947. Les brousses secondaires en Afrique équatoriale – 1. Bois et Forêts des Tropiques 2, 24–29.
- Baskin, J.M., Baskin, C., 2003. Classification, biogeography and phylogenetic relationships of seed dormancy. In: Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W., Probert, R.J. (Eds.), Seed Conservation: Turning Science into Practice. Kew Publishing, Kew, pp. 517–544.
- Butler, B., Chazdon, R.L., 1998. Species richness, spatial variation, and abundance of the soil seed bank of a secondary tropical rain forest. Biotropica 30, 214–222.
- Cerisier, F., 2009. Etude écologique et archéologique sur l'origine des peuplements de *Pericopsis elata* (Harms) Meeuwen (Assamela) des forêts semi-semperviventes du sud-est du Cameroun. Master Thesis, Gembloux Agro-Bio Tech, Belgium.
- Chandrashekhara, U.M., Ramakrishnan, P.S., 1993. Germinable soil seed banks dynamics during the gap phase of a humid tropical forest in the Western Ghats of Kerala. Indian J. Trop. Ecol. 9, 455–467.
- Chao, A., 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. Scand. J. Stat. 11, 265–270.
- Chao, A., 2005. Species richness estimation. In: Balakrishnan, N., Read, C.B., Vidakovic, B. (Eds.), Encyclopedia of Statistical Sciences. Wiley, New York, pp. 7909–7916.
- Chazdon, R.L., Colwell, R.K., Denslow, J.S., Guariguata, M.R., 1998. Statistical methods for estimating species richness of woody regeneration in primary and secondary rain forests of NE Costa Rica. In: Dallmeier, F., Comiskey, J.A. (Eds.), Forest Biodiversity Research, Monitoring and Modeling: Conceptual Background and Old World Case Studies. Parthenon Publishing, Paris, pp. 285–309.
- Colwell, R.K., 2006. EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8. URL: <url:loclo.org/estimates>.
- Colwell, R.K., Coddington, J.A., 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. Philos. T. Roy. Soc. B 345, 101–118.

- Dalling, J.W., Swaine, M.D., Garwood, N.C., 1997. Soil seed bank community dynamics in seasonally moist lowland tropical forest, Panama. *J. Trop. Ecol.* 13, 659–680.
- Dalling, J.W., Brown, T.A., 2009. Long-term persistence of pioneer species in tropical rain forest soil seed banks. *Am. Nat.* 173, 531–535.
- Dalling, J.W., Swaine, M.D., Garwood, N.C., 1998. Dispersal patterns and seed bank dynamics of pioneer trees in moist tropical forest. *Ecology* 79, 564–578.
- De Villiers, A.J., Van Rooyen, M.W., Theron, G.K., 2003. Similarity between the soil seed bank and the standing vegetation in the strandveld succulent Karoo. *S. Afr. Land Degrad. Dev.* 14, 527–540.
- Denslow, J.S., 1980. Gap partitioning among tropical rainforest trees. *Biotropica* 12, 47–95.
- DMNC, 2009. Température et pluviométrie mensuelles relevées à Lomié de 1979 à 2008. Douala, Cameroon.
- Dollet, M., Dubern, J., 1977. Maladie à proliférations affectant *Tabernaemontana crassa* Benth. Transmission par greffe et cuscute. Action de la terramycine. *Ann. Phytopathol.* 9, 447–454.
- Doucet, J.-L., 2003. L'alliance délicate de la gestion forestière et de la biodiversité dans les forêts du centre du Gabon. PhD Thesis, Gembloux Agro-Bio Tech, Belgium.
- Doucet, J.L., Kouadio, Y.L., Monticelli, D., Lejeune, P., 2009. Enrichment of logging gaps with moabi (*Baillonella toxisperma* Pierre) in a Central African rain forest. *Forest Ecol. Manage.* 258, 2407–2415.
- Floyd, A.G., 1990. Australian Rainforests in New South Wales. Surrey Beatty, Chipping Norton, Sydney.
- Garcia, M.A., 1995. Relationships between weed community and soil seed bank in a tropical agrosystem. *Agr. Ecosyst. Environ.* 55, 139–146.
- Garwood, N.C., 1989. Tropical soil seed banks: a review. In: Leck, M.A., Parker, V.T., Simpson, R.L. (Eds.), *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press, New York, pp. 149–209.
- Hall, J.S., Harris, D.J., Medjibe, V., Ashton, P.M.S., 2003. The effects of selective logging of forest structure and tree species composition in a Central African forest: implications for management of conservation areas. *Forest Ecol. Manage.* 183, 249–264.
- Hall, J.S., Swaine, M.D., 1980. Seed stocks in Ghanaian forest soils. *Biotropica* 12, 256–263.
- Hawthorne, W.D., 1995. Ecological profiles of Ghanaian forest trees. *Tropical Forestry Papers* no. 29. Oxford Forestry Institute, Oxford, UK.
- Hopkins, M.S., Graham, A.W., 1983. The species composition of soil seed banks beneath lowland tropical rainforests in North Queensland. *Aust. Biotropica* 15, 90–99.
- Hopkins, M.S., Graham, A.W., 1987. The viability of seeds of rainforest species after experimental soil burials under tropical wet lowland rainforest in north eastern Australia. *Aust. J. Ecol.* 12, 97–108.
- Hosogi, D., Kameyama, A., 2006. Timing for the planting method using deciduous forest topsoil in suburban Tokyo. *Jpn. Ecol. Eng.* 26, 123–131.
- Howlett, B.E., Davidson, D.W., 2003. Effects of seed availability, site condition, and herbivory on pioneer recruitment after logging in Sabah, Malaysia. *Forest Ecol. Manage.* 184, 369–383.
- Isselin-Noddedeu, F., Bédécarrats, A., 2007. Soil microtopographies shaped by plants and cattle facilitate seed bank formation on alpine ski trails. *Ecol. Eng.* 30, 278–285.
- Jankowska-Błaszczuk, M., Grubb, P.J., 2006. Changing perspectives on the role of soil seed bank in northern temperate deciduous forests and in tropical lowland rain forests: parallels and contrasts. *Perspect. Plant Ecol.* 8, 3–21.
- Janzen, D.H., 1988. Ecological characterization of a Costa Rican dry forest caterpillar fauna. *Biotropica* 20, 120–135.
- Kassahun, A., Snyman, H.A., Smit, G.N., 2009. Soil seed bank evaluation along a degradation gradient in arid rangelands of the Somali region, eastern Ethiopia. *Agr. Ecosyst. Environ.* 129, 428–436.
- Keay, R.W., 1960. Seeds in forest soil. *Nigeria Forestry Information Bulletin* 4, 1–4.
- Korhonen, L., Korhonen, K.T., Rautiainen, M., Stenberg, P., 2006. Estimation of forest canopy cover: a comparison of field measurement techniques. *Silva. Fenn.* 40, 577–588.
- Kouadio, Y.L., 2009. Mesures sylvicoles en vue d'améliorer la gestion des populations d'essences forestières commerciales de l'Est du Cameroun. PhD Thesis, Gembloux Agro-Bio Tech, Belgium.
- Kouadio, Y.L., Doucet, J.L., 2009. Etude du comportement de *Baillonella toxisperma* Pierre (moabi) dans les trouées d'abattage enrichies. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13, 317–324.
- Laclavère, G., 1979. Atlas de la République Unie du Cameroun. Jeune Afrique, Paris.
- Lawton, R.O., Putz, F.E., 1988. Natural disturbance and gap-phase regeneration in a wind-exposed tropical cloud forest. *Ecology* 69, 764–777.
- Leckie, S., Vellend, M., Bell, G., Waterway, M.J., Lechowicz, M.J., 2000. The seed bank in an old-growth, temperate deciduous forest. *Can. J. Bot.* 78, 181–192.
- Lee, S.M., Chao, A., 1994. Estimating population size via sample coverage for closed capture–recapture models. *Biometrics* 50, 88–97.
- Lemauiel, S., Rozé, F., Clément, B., 2005. A study of the dynamics of the seed banks in a complex dune system, with aim to restoration. *J. Coastal Res.* 21, 991–999.
- Liew, T.C., 1973. Occurrence of seeds in virgin forest top soil with particular reference to secondary species in Sabah. *Malaya For.* 36, 185–193.
- Lindner, A., 2009. A rapid assessment approach on soil seed banks of Atlantic forest sites with different disturbance history in Rio de Janeiro. *Braz. Ecol. Eng.* 35, 829–835.
- Marks, M.K., Nwachuku, A.C., 2006. Seed bank characteristics in a group of tropical weeds. *Weed Res.* 26, 151–158.
- Martins, A.M., Engel, V.L., 2007. Soil seed banks in tropical forest fragments with different disturbance histories in southeastern Brazil. *Ecol. Eng.* 31, 165–174.
- Mbarga, R.B., Jonkers, W.B.J., Etoundi, J., 1999. Phénologie de 86 essences productrices de bois d'oeuvre de la forêt dense humide sempervirente du Sud-Cameroun – Résultats préliminaires. In: Nasi, R., Amsallem, L., Drouineau, S. (Eds.), *La gestion des forêts denses africaines aujourd'hui: Actes du séminaire Forafri de Libreville, Gabon. CIRAD-Forêt, Montpellier*. URL: http://www.tropenbos.nl/tbi_publications/documents/FORAFRI-bibani.pdf.
- Metcalfe, D.J., Turner, I.M., 1998. Soil seed bank from lowland rain forest in Singapore: canopy-gap and litter-gap demanders. *J. Trop. Ecol.* 14, 103–108.
- Paletto, A., Tosi, V., 2009. Forest canopy cover and canopy closure: comparison of assessment techniques. *Eur. J. For. Res.* 128, 265–272.
- Perera, G.A.D., 2005. Spatial heterogeneity of the soil seed bank in the tropical semi-deciduous forest at Wasgomuwa National Park. *Sri Lanka Trop. Ecol.* 46, 79–89.
- Putz, F.E., Appanah, B., 1987. Buried seeds, newly dispersed seeds, and the dynamics of a lowland forest in Malaysia. *Biotropica* 19, 326–339.
- Russel-Smith, J., Setterfield, S.A., 2006. Monsoon rain forest seedlings dynamics, northern Australia: contrasts with regeneration in eucalypt-dominated savannas. *J. Biogeogr.* 33, 1597–1614.
- Schmidt, L., 2007. *Tropical Forest Seed*. Springer, Berlin.
- Skoglund, J., 1992. The role of seed banks in vegetation dynamics and restoration of dry tropical systems. *J. Veg. Sci.* 3, 357–360.
- StatSoft France, 2004. STATISTICA (logiciel d'analyse de données), version 6. URL: www.statsoft.com.
- Swaine, M.D., Whitmore, T.C., 1988. On the definition of ecological species groups in tropical rainforest. *Vegetatio* 75, 81–86.
- Symington, C.F., 1933. The study of secondary growth on rain forest sites in Malaya. *Malaya For.* 2, 107–117.
- Ten Hoopen, M., Kapelle, M., 2006. Soil seed bank changes along a forest interior-edge-pasture gradient in a Costa Rican montane oak forest. In: Kapelle, M. (Ed.), *Ecology and Conservation of Neotropical Montane Oak Forests*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 299–308.
- Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C., Baskin, J.M., 2003. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91, 294–304.
- Uasuf, A., Tigabu, M., Odèn, P.C., 2009. Soil seed banks and regeneration of neotropical dry deciduous and gallery forests in Nicaragua. *Bois et Forêts des Tropiques* 299, 49–62, valier, Paris.
- Venable, D.L., Brown, J.S., 1988. The selective interactions of dispersal, dormancy, and seed size as adaptations for reducing risk in variable environments. *Am. Nat.* 131, 360–384.
- Walther, B.A., Moore, J.L., 2005. The concepts of bias, precision and accuracy, and their use in testing the performance of species richness estimators, with a literature review of estimator performance. *Ecography* 28, 815–829.
- Warr, S., Thompson, K., Kent, M., 1993. Seed banks as a neglected area of biogeographic research: a review of literature and sampling techniques. *Prog. Phys. Geog.* 17, 329–347.
- Williams, L., Reich, P., Capon, S.J., Raulings, E., 2008. Soil seed banks of degraded riparian zones in southeastern Australia and their potential contribution to the understorey vegetation. *River Res. Appl.* 24, 1002–1017.