

ANALYSE SPATIALE ET FONCTIONNELLE DE LA DIVERSITÉ D'UN SYSTÈME SYMBIOTIQUE EN MILIEUX INSULAIRE ET CONTINENTAL

Cas du *Pterocarpus officinalis* Jacq. et de ses
microorganismes associés en forêt marécageuse

Coordinateur : Amadou Moustapha BÂ,
Laboratoire de Biologie et Physiologie
Végétales, UFR des Sciences Exactes et
Naturelles, Université des Antilles et de
la Guyane, BP. 592, 97159 Pointe-à-Pitre,
Guadeloupe, amadou.ba@univ-ag.fr

Autres participants au projet : Gilles
Béna, Bernard Dreyfus, Christine Le Roux,
Yves Prin (UMR 113 Symbioses Tropicales
et Méditerranéennes IRD/INRA/CIRAD/
ENSA-M/UM2, Montpellier), Jean-Marc
Bouvet (CIRAD), Maguy Dulormne, Daniel
Imbert, Félix Muller, Alain Rousteau
(Université Antilles-Guyane), Christian
Plenchette (INRA)

Mots clés : *Bradyrhizobium*, champignons mycorhiziens à
arbuscules, salinité, inondation, Grande Caraïbe

Rappel du contexte scientifique et des objectifs du projet

Dans la région caraïbe (îles et continent), la forêt marécageuse à *Pterocarpus officinalis* est une formation remarquable qui se développe sur des sols inondés ou temporairement inondés en arrière de la mangrove, en bordure de rivière et dans des dépressions humides en montagne (Eusse et Aide, 1999 ; Imbert *et al.*, 2000). Dans les Antilles, l'espèce peut représenter jusqu'à 90 % de la strate arborée (Alvarez-Lopez, 1990). En Guadeloupe, la forêt marécageuse à *P. officinalis* couvre environ 2600 ha dont 460 ha dans la réserve naturelle du grand-cul-de-sac marin où elle fait l'objet d'un statut de protection (Imbert *et al.*, 2000). Cette forêt marécageuse est en régression à cause

des effets conjugués de l’extension des infrastructures routières et des activités agricoles. *P. officinalis* a été exploité en Guadeloupe pour alimenter les distilleries jusqu’au milieu du XX^e siècle. Actuellement, cet arbre est exploité par les Saramacas en Guyane qui l’ont adopté pour ses qualités remarquables dans l’artisanat.

Les forêts marécageuses à *P. officinalis* sont peu connues aussi bien en ce qui concerne leur structuration que leur dynamique en particulier dans le milieu insulaire (Rivera-Ocasio *et al.*, 2002). Un des objectifs de ce projet était d’analyser la structuration de la diversité infra-spécifique de *P. officinalis* à différentes échelles spatio-temporelles et en fonction des contraintes du milieu. Le milieu insulaire présente à cet égard des caractéristiques géographiques et biologiques très spécifiques (syndrome d’insularité). Il permet également de comprendre les effets de la fragmentation sur la structuration de la diversité génétique des espèces forestières.

La diversité des symbioses fixatrices d’azote et mycorhiziennes est un aspect très peu étudié sur *P. officinalis* (Saur *et al.*, 1998 ; Bâ *et al.*, 2004). Aucune étude n’avait porté sur la diversité génétique conjointe des partenaires de ces deux types de symbiose. Un autre objectif de ce projet était d’évaluer parallèlement la diversité infra-spécifique des populations de *P. officinalis* et des microorganismes associés en forêt marécageuse dans différents sites en milieu insulaire (Guadeloupe,

Tableau 1 : Paramètres de diversité obtenus avec des microsatellites chloroplastique et nucléaire chez des populations de *P. officinalis*.

îles / pays	Population	Microsatellites Nucleaires						
		N_{nuc}	na_{nuc}	R_{nuc}	Ho_{nuc}	He_{nuc} (SD)	F_{is}	
Guadeloupe	Belle Plaine	36	4.50	3.02	0.44 (0.23)	0.49 (0.28)	0.110**	
Guadeloupe	Deshaies	20	2.50	2.2	0.38 (0.32)	0.38 (0.31)	0.025 ns	
Guadeloupe	Le moule	20	2.83	2.63	0.36 (0.20)	0.45 (0.24)	0.249**	
Marie Galante	Bois de Folle Anse	20	2.50	2	0.36 (0.20)	0.24 (0.21)	0.217**	
Dominique	Indian River	20	3.33	2.58	0.25 (0.22)	0.38 (0.23)	0.368***	
Martinique	le Galion	20	4.17	3.02	0.42 (0.34)	0.39 (0.27)	-0.043 ns	
Puerto Rico	El Yunque	13	1.67	1.64	0.20 (0.28)	0.26 (0.24)	0.307**	
Puerto Rico	Sabana Seca	20	3.17	2.58	0.47 (0.19)	0.46 (0.12)	0.038*	
Guyane Française	la crique Alexandre	33	5.33	4.12	0.50 (0.22)	0.59 (0.24)	0.173***	
Total		202	9.67	-	0.36 (0.17)	0.57 (0.21)	0.36***	

Marie-Galante, Martinique, Dominique et Porto Rico) et continental (Guyane française), et en fonction de contraintes édaphiques (salinité et inondation).

En période d'inondation, les sols marécageux sont hypoxiques et parfois anoxiques. Ces conditions sont défavorables à une bonne dégradation de la matière organique et donc à la minéralisation de l'azote et du phosphore organique. La dénitrification et le lessivage accentuent aussi les carences en azote et en phosphore (Barrios et Herrera, 1993). En période d'exondation, l'évapotranspiration entraîne des remontées de sel par capillarité. Un troisième objectif de ce projet était d'étudier le rôle des rhizobiums et des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sur l'adaptation du *P. officinalis* à l'inondation et à la salinité.

Principaux résultats acquis

Pour étudier la diversité génétique et la structuration de *P. officinalis* dans la région Caraïbe, nous avons analysé 202 individus provenant de 8 populations insulaires et d'une population de Guyane française (Muller *et al.*, 2006 a). Nous avons développé spécifiquement et sélectionné huit marqueurs microsatellites nucléaires pour leur polymorphisme (4 à 20 allèles) chez *P. officinalis*. En parallèle, 3 loci

Microsatellites chloroplastiques				
N_{cp}	na_{cp}	ne_{cp}	H_{cp} (SD)	
28	4	2.56	0.63 (0.06)	
15	3	2.06	0.36 (0.14)	
9	2	1.25	0.22 (0.17)	
16	3	2.25	0.36 (0.07)	
18	3	2.79	0.68 (0.06)	
10	3	1.52	0.38 (0.18)	
-	-	-	-	
12	2	1.95	0.53 (0.08)	
8	3	1.68	0.46 (0.20)	
116	10	3.67	0.63 (0.07)	

N = nombre d'individus;
 na = nombre d'allèles par locus;
 Ho = hétérozygotie observée;
 He = hétérozygotie attendue;
 F_{is} = indice de fixation;
 R = richesse allélique;
 P = ns, $P > 0.05$;
 $*$, $P < 0.05$;
 $**$, $P < 0.01$;
 $***$, $P < 0.001$.

microsatellites chloroplastiques ont été identifiés à partir d'amorces universelles. Les résultats obtenus à partir des deux types de marqueurs microsatellites sont récapitulés dans le tableau 1. Les paramètres de diversité chloroplastique varient nettement entre les populations. Ainsi, la population de Moule en Guadeloupe est celle qui présente les plus faibles variations ($H_p = 0,22$), alors que la plus variable est celle d'Idian River en Dominique ($H_p = 0,68$). Dans tous les cas, comme on pouvait s'y attendre pour des populations présentes sur des îles de petite taille, les populations insulaires montrent des valeurs inférieures par rapport aux populations continentales. Ce résultat est conforté par les microsatellites nucléaires qui montrent, eux aussi une diversité plus importante sur le continent que dans les îles. Les indices de fixation, varie de $F_{is} = -0,043$ à $F_{is} = 0,368$, pour les populations de Deshaies et du Galion, respectivement. Un déficit en hétérozygote significatif a été observé dans toutes les populations étudiées, ce qui peut être interprété comme le résultat d'un effet fondation dans les petites îles ou dans les populations isolées. Les indices de structuration observés avec les marqueurs chloroplastique et nucléaire, respectivement $F_{stcp} = 0,58$ and $F_{stnuc} = 0,29$, sont importants et à relier à un faible taux de dissémination du pollen et des graines. Cependant, les flux de graines par rapport au flux de pollen indiquent une valeur de $P/G = 2,88$ pour toutes les populations confondues, ce qui est très inférieur aux valeurs retrouvées généralement chez des populations continentales d'angiospermes chez qui le pollen est le moyen de dissémination génétique préférentiel. On peut donc penser que les graines jouent un rôle prépondérant dans la dissémination de cette espèce, résultat qui a été confirmé par la viabilité décroissante de graines de *P. officinalis* ayant séjourné jusqu'à un mois dans l'eau de mer (Muller *et al.*, 2006 b).

Parallèlement, nous avons isolé et caractérisé les bactéries de nodules des différentes populations de *P. officinalis* (Muller *et al.*, 2006 c). Toutes les souches isolées appartiennent au genre *Bradyrhizobium* (figure 1). L'analyse phylogénétique des *Bradyrhizobium* par séquençage de l'ITS (internal transcribed spacer) laisse cependant apparaître la présence de trois clades distincts. Nous observons un groupe monophylétique contenant la grande majorité des souches insulaires (Guadeloupe, Martinique et Dominique, et une bonne majorité des souches porto ricaine) très proches d'une souche ouest-africaine de référence. Les deux autres groupes sont quant à eux, paraphylétiques et contiennent les souches continentales, mais aussi certaines souches porto ricaine (figure 1). Ainsi, la diversité bactérienne au niveau insulaire est plus faible que la diversité observée en milieu continental. Pour l'expliquer, trois hypothèses peuvent être formulées. Premièrement, on peut s'interroger sur la pertinence des marqueurs ITS d'autant que nos résultats récents en champs pulsés montreraient plus de

diversité que ceux mesurés ici. Deuxièmement, la faible diversité observée en milieu insulaire pourrait être le fruit d'un effet sélectif majeur de la part du couvert végétal. En effet, en milieu insulaire, *P. officinalis* représente 90% de la strate arborée et près de l'intégralité des légumineuses nodulées. Par contre, en Guyane, la population de *P. officinalis* représente environ 25% de la strate arborée qui comprend aussi 37,5% de légumineuses nodulées. Troisièmement, la forte homologie entre les souches insulaires et des souches ouest-africaines suggère un transport aérien de microorganismes de l'Afrique de l'Ouest vers la Caraïbe à l'occasion d'événements climatiques comme les cyclones (Prospero *et al.*, 2005).

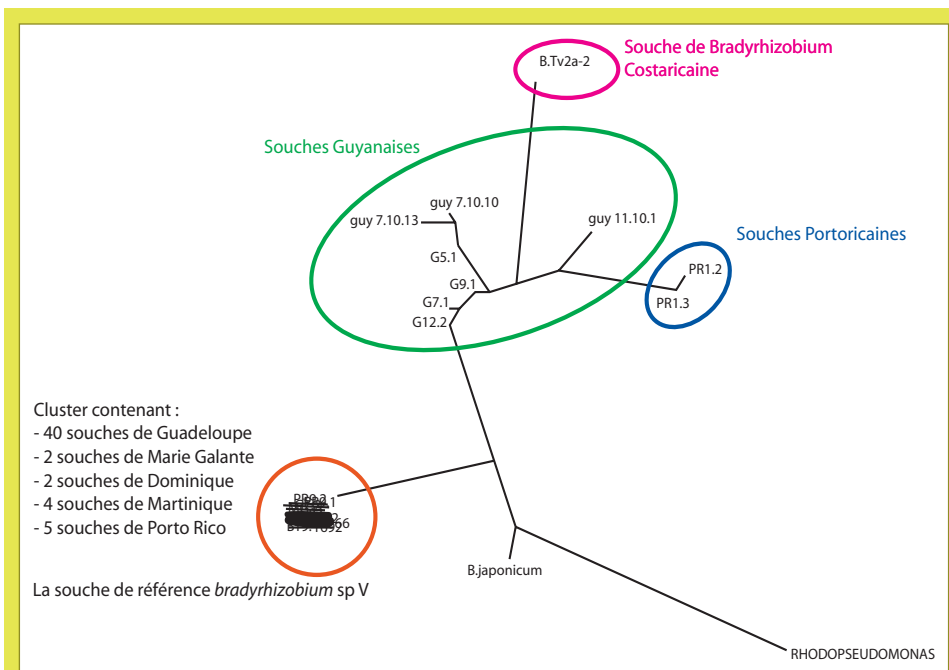


Figure 1 : Arbre phylogénétique non enraciné des séquences ITS de différentes souches de *Bradyrhizobium* provenant d'îles, du continent, et de séquences ITS de souches de référence (*B. sp V*, *B. tv2a-2*, *B. japonicum*, *Rhodopseudomonas*) (Muller *et al.*, 2006 c).

Outre les *Bradyrhizobium*, *P. officinalis* est colonisé par des champignons mycorhiziens à arbuscules (Bâ *et al.*, 2004 ; Saint-Etienne *et al.*, 2006). L'absence de spores dans les sols marécageux n'a pas permis l'identification taxonomique des champignons mycorhiziens à arbuscules inféodés à *P. officinalis*. Les CMA sont présents uniquement sous forme de mycélium libre et en symbiose avec *P. officinalis*. Le potentiel mycorhizien des sols marécageux et le taux de colonisation des racines de *P. officinalis* diminuent le long du gradient de salinité en saison sèche (2-26‰) comme en saison humide (5-22‰). Les CMA de *P. officinalis* seraient tolérants jusqu'à 10‰ de sel.

Nous avons étudié la tolérance au NaCl (0, 10 et 20‰) de *P. officinalis* en symbiose avec deux souches de *Bradyrhizobium* provenant de milieu salé ou non (Dulorme *et al.*, en préparation). En l'absence de sel, l'inoculation a eu un effet bénéfique sur la production de biomasse du *Pterocarpus*. À 10‰ de NaCl, la biomasse des plants inoculés est comparable à celle des plants non inoculés à cause de la baisse du nombre de nodules et de l'activité fixatrice d'azote. Cette dose de NaCl n'a d'ailleurs pas affecté la production de biomasse des plants non inoculés. Les ions Cl⁻ et Na⁺ se sont accumulés davantage dans les racines que dans les tiges et les feuilles du *P. officinalis*. L'effet toxique des ions Na⁺ et Cl⁻ dans les feuilles se serait donc trouvé atténué par leur rétention dans les racines sans que l'on connaisse clairement les mécanismes de régulation. Ces résultats sont en accord avec nos observations de terrain qui montrent une prolifération de plantules sous le houppier de l'arbre à des concentrations de sels proches de 10‰ et, par contre, une faible régénération dans les zones plus salées de l'arrière mangrove (forte mortalité des plantules de *P. officinalis* à une concentration de sels de 20‰).

P. officinalis est également soumis à l'inondation pendant une partie de l'année. Nous avons étudié le rôle de *Bradyrhizobium* sp. et de *Glomus intraradices* dans la tolérance à l'inondation de *P. officinalis* en serre (Fougnies *et al.*, 2006). *P. officinalis* a mieux poussé en milieu inondé qu'en milieu exondé indépendamment de l'inoculation. L'apparition de racines adventives, d'aérenchymes et de lenticelles a été tout à fait remarquable sur la partie submergée des tiges. Les plantules de *P. officinalis* ont donc développé des mécanismes d'adaptation à l'inondation comparables à ceux des plantes aquatiques (Liao et Lin, 2001). Chez les plants inoculés, l'inondation a induit aussi la formation de nodules caulinaires et de mycorhizes à arbuscules sur les racines adventives. Ce résultat est original car c'est la première fois que des nodules de tiges et des mycorhizes à arbuscules de racines adventives sont observés chez une légumineuse arborescente. L'inoculation avec la souche *Bradyrhizobium* sp. n'a pas d'effet bénéfique sur la biomasse totale du *Pterocarpus* notamment en milieu inondé malgré l'activité fixatrice d'azote (ARA) dans les nodules et l'acquisition d'azote dans les feuilles. La souche *G. intraradices* s'est révélée, par contre, efficace sur la biomasse totale des *P. officinalis* grâce à une colonisation racinaire tout à fait remarquable en milieu inondé. Cette colonisation racinaire par le champignon s'est aussi traduite par une augmentation du phosphore dans les feuilles. L'oxygénation des parties submergées de la tige au travers des lenticelles, des racines adventives et des aérenchymes, pourrait favoriser la colonisation remarquable du système racinaire de *Pterocarpus* par le champignon mycorhizien à arbuscules. La double inoculation n'a cependant pas permis de mettre en évidence une synergie d'action des deux symbiotes sur la croissance et la fixation d'azote des *Pterocarpus*.

Conclusions et perspectives

L'aire de répartition de *P. officinalis* s'étend de l'Amérique continentale aux petites îles de la mer des Caraïbes. Du fait de leur isolement et de leur petite taille, les îles exacerbent les effets de dérive génétique, de dépression consanguine, et de différenciation entre les populations d'une même espèce (Barrett, 1996). Nos résultats expérimentaux ont confirmé les modèles théoriques en montrant d'une part, une forte différenciation entre les populations insulaires et, d'autre part, une faible diversité génétique dans les îles (Frankham, 1998). Ce type de structure de diversité génétique amplifie les risques d'extinction chez les espèces soumises à des pressions anthropiques (Frankham *et al.*, 2002). C'est le cas de certaines populations de Dominique ou de Guadeloupe qui se limitent à quelques individus. De plus, les forts indices de fixation trouvés dans certaines îles suggèrent la présence de consanguinité qu'il est nécessaire de lier à un risque inhérent d'extinction.

La diversité des populations de *Pterocarpus* comme celle des *Bradyrhizobium* associées est plus faible en milieu insulaire qu'en milieu continental. Les populations de *Pterocarpus* et leurs bactéries auraient donc évolué en parallèle, conséquence possible de forces évolutives similaires (flux de gènes limités et fortes dérives génétiques attendues en milieu insulaire).

Malgré l'absence de spores de glomales dans les sols marécageux, le potentiel mycorhizien reste relativement important entre 8 et 10% de sels le long du gradient de salinité. Les CMA sont présents dans ces sols sous forme de mycélium libre et de fragments de racines mycorhizées. L'utilisation d'outils moléculaires (séquençage de l'ITS) sera nécessaire pour identifier les CMA à partir des fragments de mycorhizes.

P. officinalis développe des mécanismes d'adaptation morphologique (lenticelles, racines adventives, aerenchymes) et physiologique (nodules de tige et mycorhizes à arbuscules des racines adventives) en milieu inondé. La mycorhization est efficace sur la croissance des *Pterocarpus* notamment en milieu inondé. Nous envisageons d'évaluer l'adaptation du *P. officinalis* et de ses symbiotes face aux deux contraintes (sel et inondation). Nous pourrions ainsi mieux appréhender le rôle des champignons mycorhiziens à arbuscules et des *Bradyrhizobium* sur la croissance de *P. officinalis* en vue de restaurer les forêts marécageuses dégradées et menacées d'extinction en Guadeloupe.

Références bibliographiques

- Alvarez-Lopez M., 1990. Ecology of *Pterocarpus officinalis* forested wetlands in Puerto Rico. In Lugo A. E., Brinson M. et Brown S. (eds), *Ecosystems of the World 15, Forested Wetlands*. Amsterdam, Elsevier, 251-265.
- Bâ A.M., Samba R., Sylla S., Le Roux C., Neyra M., Rousteau A., Imbert D., Toribio A., 2004. Caractérisation de la diversité des microorganismes symbiotiques de *Pterocarpus officinalis* dans des forêts marécageuses de Guadeloupe et Martinique. *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)*, 59 : 163-170.
- Barrett S. C. H., 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society London*, 351 : 725-733.
- Barrios E., Herrera R., 1993. Nitrogen cycling in a Venezuelan tropical seasonally flooded forest : soil nitrogen, mineralization and nitrification. *Journal of Tropical Ecology*, 10 : 399-416.
- Dulorme M.M., Musseau O., Toribio A., Bâ A.M., 2006. Salt tolerance of *Pterocarpus officinalis* Jacq. a legume tree in the tropical wetland in the West Indies: growth, water relation, nodulation, nitrogen fixation and ion distribution (in preparation).
- Eusse A.M., Aide T.M., 1999. Patterns of litter production across a salinity gradient in a *Pterocarpus officinalis* tropical wetland. *Plant Ecology*, 145 : 307-315.
- Frankham R., 1998. Inbreeding and extinction : island populations. *Conservation Biology*, 15:665-675.
- Frankham R., Briscoe D. A., Ballou J. D., 2002. *Introduction to conservation genetics*. New York, USA, Cambridge University Press.
- Fougnies L., Renciot S., Muller F., Plenchette C., Prin Y., De Faria S.M., Bouvet J.M., Sylla S.N.D., Dreyfus B., Bâ A.M., 2006. Nodulation and arbuscular mycorrhizal colonization improve flooding tolerance in *Pterocarpus officinalis* Jacq. seedlings. *Mycorrhiza* (soumis).
- Imbert D., Bonhême I., Saur E., Bouchon C., 2000. Floristics and structure of the *Pterocarpus officinalis* swamp forest in Guadeloupe, Lesser Antilles. *Journal of Tropical Ecology*, 16 : 55-68.
- Liao C.T., Lin C.H., 2001. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proc Natl Sci Counc*, 25: 148-157.

Muller F, Vaillant A., Bâ A.M., Bouvet J.M., 2006 a. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Pterocarpus officinalis* Jacq. *Molecular Ecology Notes*, 6 : 462-464.

Muller F, Voccia M., Bâ A.M., Bouvet J.M., 2006 b. Pattern of genetic diversity and gene flow of a tree species distributed continental and insular Caribbean zones: case of *Pterocarpus officinalis* Jacq. (en préparation).

Muller F, Le Roux C., Prin Y., Béna G., Bouvet J.M., Bâ A.M., Dreyfus B., 2006 c. Genetic diversity of *Bradyrhizobia* associated with the wetland tree *Pterocarpus officinalis* in the Caribbean basin (en préparation).

Prospero J.M., Blades E., Mathison G., Naidu R., 2005. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 21 : 1-19

Rivera-Ocasio E, Aide T.M., McMillan WO, 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.) in the Caribbean basin. *Molecular Ecology*, 11 : 675-683.

Saint-Etienne S., Paul S., Imbert D., Dulormne M.M., Muller F, Toribio A., Planchette C., Bâ A.M., 2006. Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient. *Forest Ecology and Management* (in press).

Saur E., Bonhême I., Nygren P., Imbert D., 1998. Nodulation of *Pterocarpus officinalis* in the swamp forest of Guadeloupe (Lesser Antilles). *Journal of Tropical Ecology*, 14 : 761-770.